

## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES DES ORGANISMES ET ÉCOLOGIE

#### Effets d'une exposition chronique à l'Aroclor 1254 sur le développement et la métamorphose du xénope *Xenopus laevis*: approche écotoxicoprotéomique

Roland, Kathleen

*Award date:*  
2007

*Awarding institution:*  
Université de Namur

[Link to publication](#)

#### General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

<b>AVANT-PROPOS.....</b>	<b>1</b>
1. LES POLYCHLOROBIPHENYLES .....	1
1.1. Introduction.....	1
1.2. Les PolyChloroBiphényles .....	1
1.2.1. Historique .....	1
1.2.2. Structure et composition .....	2
1.2.3. Les catégories de PCBs .....	2
1.2.4. Propriétés et utilisations.....	2
1.2.5. Transport et bioaccumulation .....	3
1.3. La toxicité des PCBs .....	3
1.3.1. Voies d'entrée.....	3
1.3.2. Les PCBs et leurs cibles .....	3
1.3.3. Modes d'action .....	4
1.3.3.1. Métabolisation.....	4
1.3.3.2. Le récepteur Ah et l'induction du cytochrome P450-1A1 .....	5
2. LA METAMORPHOSE ET LE DEVELOPPEMENT DES AMPHIBIENS ANOURES .....	6
2.1. La métamorphose .....	6
2.1.1. La prémétamorphose .....	6
2.1.2. La prométamorphose .....	6
2.1.3. Le climax métamorphique .....	6
2.2. La glande thyroïde et la métamorphose .....	7
2.2.1. Les hormones thyroïdiennes .....	7
2.2.2. Implication de l'axe hypothalamo-hypophysaire .....	7
2.2.3. Mécanismes d'action des hormones thyroïdiennes .....	8
2.2.3.1. Les protéines de liaison des hormones thyroïdiennes.....	8
2.2.3.2. Les récepteurs des hormones thyroïdiennes .....	8
2.2.3.3. Les déiodinases I, II et III.....	9
2.2.3.4. Les mécanismes de régulation transcriptionnelle par les TRs .....	10
2.3. Le remodelage tissulaire pendant la métamorphose.....	10
2.3.1. Introduction .....	10
2.3.2. Morphogenèse du système nerveux central .....	11
2.3.3. Le remodelage du système nerveux .....	11
2.3.3.1. Morphologie et histologie du système nerveux central .....	11
2.3.3.2. Variation de l'expression des gènes .....	12
2.3.3.3. Les hormones thyroïdiennes et le système nerveux.....	12
3. EFFETS TOXIQUES DES PCBs .....	13
3.1. Impact des PCBs sur les amphibiens .....	13
3.1.1. Effets des PCBs sur le développement et la métamorphose.....	13
3.1.2. Effets des PCBs sur le comportement et la morphologie .....	14
3.1.3. Effets des PCBs sur l'expression de gènes .....	14
3.2. Les PCBs et la neurotoxicité .....	14
3.3. La neurotoxicité médiée par une altération des hormones thyroïdiennes.....	16
4. INTERET D'UNE APPROCHE COMBINEE GENOMIQUE - PROTEOMIQUE .....	17
4.1. L'approche transcriptomique.....	17
4.2. L'approche protéomique en écotoxicologie .....	17
5. OBJECTIFS .....	19
<b>MATERIEL ET METHODES.....</b>	<b>20</b>
1. CHOIX DU MODELE BIOLOGIQUE.....	20
2. ELEVAGE DES XENOPES .....	20
3. INDUCTION DE LA REPRODUCTION ET DE LA PONTE .....	20
4. TRAITEMENT DES ŒUFS .....	21
5. SCHEMA EXPERIMENTAL .....	21
6. CHOIX DES STADES DE DEVELOPPEMENT POUR LES PRELEVEMENTS .....	21
7. PARAMETRES MESURES ET OBSERVES DURANT L'EXPERIENCE .....	22
8. DOSAGE DES PCBs DANS L'EAU, LES ALIMENTS ET LES TISSUS DES TETARDS DE <i>XENOPUS LAEVIS</i> .....	22
9. EXTRACTION ET DOSAGE DES HORMONES THYROÏDIENNES T3 ET T4 .....	22
9.1. Extraction des hormones thyroïdiennes T3 et T4 dans les matrices biologiques .....	23
9.2. Dosage des hormones thyroïdiennes T3 et T4 par la technique du Radioimmunoassay.....	24
9.2.1. Principe.....	24
9.2.2. Méthode.....	25
10. ANALYSE PROTEOMIQUE .....	25

10.1.	Extraction des protéines des échantillons .....	26
10.2.	Dosage des protéines par la méthode Bradford.....	26
10.3.	Préparation des échantillons .....	26
10.4.	Electrophorèse en IEF .....	27
10.5.	Electrophorèse SDS-PAGE.....	27
10.6.	Révélation.....	27
10.6.1.	Coloration à l'argent.....	27
10.6.2.	Le 2D-DIGE.....	28
10.6.3.	Coloration au krypton.....	28
11.	LA SPECTROMETRIE DE MASSE.....	29
11.1.	Couplage chromatographie liquide – spectrométrie de masse en tandem.....	29
11.2.	Score de MOWSE.....	29
12.	TRAITEMENT STATISTIQUE DES DONNEES .....	30
<b>RESULTATS.....</b>		<b>32</b>
1.	TAUX DE SURVIE, POIDS ET MORPHOLOGIE DES TETARDS DE <i>XENOPUS LAEVIS</i> .....	32
1.1.	Rappel du protocole expérimental .....	32
1.2.	Taux de survie .....	32
1.3.	Poids des larves.....	33
1.4.	Morphologie des têtards.....	34
2.	VALIDATION DES CONTAMINATIONS DES ORGANISMES .....	34
3.	EVALUATION DU CONTENU EN HORMONES THYROÏDIENNES DANS DIFFERENTS ORGANES.....	36
3.1.	Mâchoires inférieures .....	36
3.2.	Foies.....	37
3.3.	Cerveaux.....	38
4.	ANALYSE PROTEOMIQUE .....	40
5.	IDENTIFICATION DES PROTEINES.....	41
<b>DISCUSSION .....</b>		<b>43</b>
1.	MODIFICATIONS DES TAUX DE SURVIE, DU POIDS ET DE LA MORPHOLOGIE DES TETARDS LORS D'UNE EXPOSITION A LONG TERME A DE L' AROCLOR 1254 .....	43
1.1.	Modification du taux de survie.....	43
1.2.	Modification du poids.....	45
1.3.	Altération de la morphologie de la queue des têtards.....	46
2.	EFFET D'UNE EXPOSITION A LONG TERME A DE L' AROCLOR 1254 SUR LE CONTENU EN HORMONES THYROÏDIENNES DANS DIVERS ORGANES.....	47
3.	DOSAGE DES PCBs DANS LES ORGANISMES DE <i>XENOPUS LAEVIS</i> EXPOSES A DE L' AROCLOR 1254 AINSI QUE DANS L'EAU ET L' ALIMENTATION .....	49
4.	MODIFICATION DE L'EXPRESSION DES PROTEINES SUITE A UNE EXPOSITION AUX PCBs.....	50
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....</b>		<b>58</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>		<b>60</b>

# Première partie

## Introduction

## Avant-propos

La contamination de l'environnement avec des composés organochlorés est un problème majeur, avec des conséquences négatives évidentes pour la faune sauvage, mais également pour l'homme. Le développement et la reproduction sont souvent affectés de manière significative par ces contaminants souvent toxiques, bioaccumulables et persistants. Les polychlorobiphényles (PCBs) font partie de ces polluants. Malgré l'interdiction progressive de leur utilisation dans l'industrie dans les années 1970, ils sont encore présents dans l'environnement et participent, notamment, au déclin des populations d'amphibiens observé partout dans le monde. Les PCBs seraient également associés aux nombreuses malformations qui sont découvertes de plus en plus fréquemment chez les têtards en milieu naturel. En effet, les amphibiens sont particulièrement sensibles aux PCBs et autres composés toxiques. La présence chez la plupart des espèces d'une peau fortement perméable ainsi que d'un développement aquatique des œufs et des larves favorisent l'absorption des polluants (Gutleb *et al.*, 1999). Ces organismes sont donc des modèles particulièrement intéressants dans le cadre d'études écotoxicologiques.

Chez les amphibiens, une des cibles premières des PCBs est le système nerveux central. Ce système, qui subit un remodelage tissulaire important durant la métamorphose, est particulièrement sensible à toute contamination.

L'étude de l'impact des polychlorobiphényles sur le système nerveux des amphibiens peut être intéressante non seulement pour la compréhension du déclin de leurs populations mais également dans le cadre d'une problématique humaine. Des problèmes comportementaux ont été observés lors d'études menées sur les grenouilles léopards *Rana pipiens* issues de régions contaminées (Savage *et al.*, 2002). Parallèlement, au niveau humain, la proposition d'une corrélation entre les PCBs et des retards mentaux chez les enfants est de plus en plus fréquemment avancée. La compréhension de l'action de ces polluants au niveau cérébral est donc d'une grande importance.

### 1. Les polychlorobiphényles

#### **1.1. Introduction**

Les PolyChloroBiphényles (PCBs) sont des contaminants environnementaux qui appartiennent à la famille des Polluants Organiques Persistants (POPs) (Tableau I.1), famille définie par le Protocole d'Aarhus en 1998 ainsi que par la Convention de Stockholm (détail dans l'encadré en vis-à-vis). Les POPs rassemblent des substances organiques qui possèdent des caractéristiques toxiques, qui sont persistantes dans l'environnement et bioaccumulables. Les PCBs font également partie de la classe des Hydrocarbures Aromatiques PolyHalogénés (PHAHs).

#### **1.2. Les PolyChloroBiphényles**

##### **1.2.1. Historique**

Les PCBs ont été synthétisés pour la première fois en Allemagne en 1881. En 1929, suite au développement de l'industrie électrique, la production des PCBs à l'échelle mondiale commença réellement avec la firme Monsanto aux Etats-Unis.

Différents noms sont attribués aux mixtures complexes de PCBs en fonction de la firme qui les commercialise : Aroclor<sup>®</sup> (Monsanto, Etats-Unis), Clophen<sup>®</sup> (Bayer, Allemagne), Kanechlor<sup>®</sup> (Kanegafuchi, Japon), Santotherm<sup>®</sup> (Mitsubishi, Japon), Phenoclor<sup>®</sup> et Pyralène<sup>®</sup> (Prodolec, France)<sup>1</sup>... Ces derniers sont vendus sous la forme d'un nom suivi de 4 chiffres, les 2 premiers référant généralement au nombre d'atomes de carbone dans le squelette biphenyle (12 pour les PCBs) et les 2 suivants indiquant le pourcentage de chlore par masse dans le mélange.

L'inquiétude qui résulta de la première découverte de PCBs dans l'environnement par Jensen en 1966, mena à l'interdiction de leur production dans les années 1970 en Europe de l'Ouest et en Amérique du Nord, alors que celle-ci continua jusqu'au début des années 1990 en Europe de l'Est et en Russie.

### 1.2.2. Structure et composition

Le terme de PCB désigne une famille de composés organochlorés de haut poids moléculaire et de formule chimique  $C_{12}H_{(10-n)}Cl_n$  dans laquelle le nombre d'atomes de chlore « n » peut varier entre 1 et 10. Les PCBs sont constitués d'un groupement biphenyle, composé non oxygéné comportant 2 noyaux aromatiques liés par une liaison simple covalente autour de laquelle peuvent pivoter les 2 cycles benzéniques. La nomenclature du biphenyle permet de localiser les positions *ortho* (2, 2', 6 et 6'), *méta* (3, 3', 5, 5') et *para* (1, 1', 4, 4') sur lesquelles viendront se fixer les atomes de chlore (Figure I.1). Quand le nombre d'atomes de chlore diffère, on parle de congénères ; on en dénombre 209.

### 1.2.3. Les catégories de PCBs

On distingue 2 catégories principales de PCBs : les PCBs coplanaires (ou dioxin-like) et les PCBs non coplanaires (Figure I.2). Les PCBs coplanaires sont capables d'adopter une configuration plane dans l'espace et la libre rotation des cycles n'est pas entravée par la taille des atomes de chlore. Ces composés sont capables de se comporter de la même manière que la 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) (Figure I.3) en présentant une certaine affinité pour le récepteur des arylhydrocarbures (AhR) et en induisant des effets toxiques comparables à ceux de la dioxine. Les PCBs non-coplanaires qui possèdent sur leurs positions *ortho-ortho'* des atomes encombrants ne peuvent pas tourner autour de leur axe. Ils n'ont pas d'affinité pour le récepteur AhR mais se lient au récepteur CAR (Constitutive Androstane Receptor) impliqué dans l'induction du cytochrome P450-2B. Ces congénères présentent une spécificité d'action, en particulier comme promoteurs de la cancérogenèse et comme inducteurs d'effets neurotoxiques et neurocomportementaux (Ahlborg *et al.*, 1994).

### 1.2.4. Propriétés et utilisations

Les propriétés physico-chimiques des PCBs dépendent du degré de substitution par le chlore mais aussi du positionnement de ce dernier sur les groupements biphenyles. Les PCBs sont des molécules très stables d'un point de vue thermique, chimique et physique. Ils sont non hydrolysables, ininflammables, ils résistent à l'oxydation et ne réagissent ni avec les bases ni les acides. De plus, ces composés sont faiblement solubles dans l'eau. Leur solubilité, tout comme leur pression de vapeur et leur dégradabilité, diminuent avec l'augmentation du degré de chloration (Loganathan & Kannan, 1994).

<sup>1</sup> ([http://www.chem.unep.ch/pops/POPS\\_Inc/proceedings/bamako/eng/FIEDLER1.html](http://www.chem.unep.ch/pops/POPS_Inc/proceedings/bamako/eng/FIEDLER1.html))

Ces différentes propriétés physico-chimiques expliquent pourquoi les PCBs ont été massivement utilisés en tant que fluides diélectriques pour les condensateurs et transformateurs, fluides hydrauliques, lubrifiants, diluants organiques et, additifs dans les pesticides, les adhésifs et les plastiques.

### **1.2.5. Transport et bioaccumulation**

Le lessivage des sols, la volatilisation, les mouvements de l'air et de l'eau et enfin les organismes vivants sont les transporteurs les plus fréquents susceptibles de disséminer les PCBs dans l'environnement. Ces substances chimiques ont des temps de résidence très longs dans l'atmosphère. Ils ne sont donc pas rapidement redéposés sur le sol ou sur la végétation par la pluie et vont pouvoir contaminer des régions éloignées de leur source d'émission.

Leur lipophilie, leur hydrophobicité et leur résistance à la biotransformation induisent une bioaccumulation et une bioamplification dans les chaînes alimentaires. Les PCBs peuvent d'abord s'accumuler au niveau du phytoplancton qui possède des vacuoles contenant des réserves lipidiques. La bioamplification se poursuivra chez le zooplancton se nourrissant du phytoplancton et ainsi de suite. Ce sont les prédateurs se trouvant en fin de chaîne alimentaire qui accumuleront le plus de PCBs dans leurs tissus (Figure I.4).

## **1.3. La toxicité des PCBs**

### **1.3.1. Voies d'entrée**

La contamination des organismes aquatiques par les PCBs se fait principalement via l'absorption à travers les surfaces en contact avec l'extérieur (les branchies et la peau perméable), l'ingestion de nourriture contaminée, le contact avec l'eau et avec les sédiments.

La voie d'entrée majoritaire pour les organismes terrestres est la voie gastro-intestinale. Une fois entrés dans l'organisme, les PCBs s'accumulent dans les tissus riches en lipides, ou dans d'autres sites lipophiles tels que les membranes cellulaires ou les lipoprotéines. A long terme, un relargage peut se produire quand les organismes mobilisent et utilisent leurs réserves de graisses, augmentant ainsi la concentration en PCBs dans leur corps jusqu'à des niveaux parfois dommageables (Walker *et al.*, 1996 cité dans Bodin, 2005).

### **1.3.2. Les PCBs et leurs cibles**

Les effets des PCBs sur les organismes sont très nombreux et touchent à peu près tous les systèmes biologiques. Ces composés affectent notamment les systèmes immunitaire et reproducteur. Ils sont carcinogènes, mutagènes, tératogènes, neurotoxiques, ils provoquent une perte de poids, des perturbations endocriniennes, une hépatotoxicité, ... (Cravedi et Narbonne, 2002).

Les réponses toxiques dans les systèmes biologiques face à ces substances dépendent, entre autres, de l'espèce considérée, de son niveau dans la chaîne alimentaire, de l'âge et du sexe de l'individu, de la période d'exposition, de la coplanarité du congénère, du degré et de la position des atomes de chlore sur le squelette carboné (Safe, 1994 ; Giesy et Kannan, 2002).

### 1.3.3. Modes d'action

#### 1.3.3.1. Métabolisation

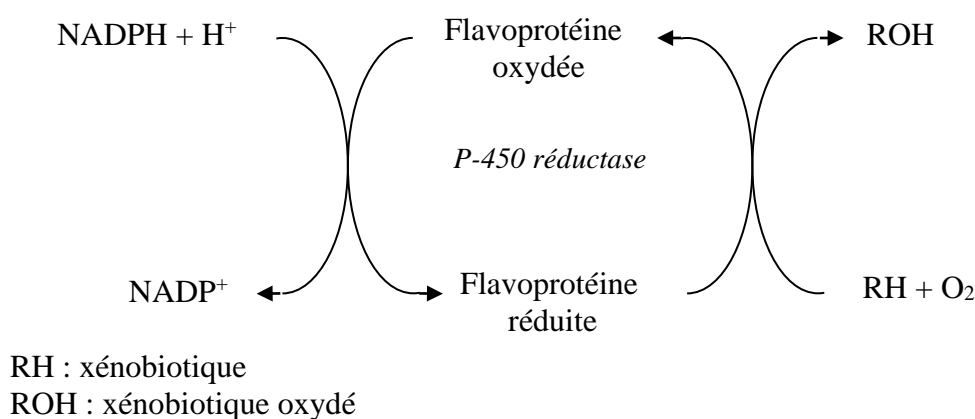
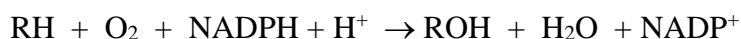
Contrairement aux végétaux, les animaux possèdent une certaine capacité à métaboliser les PCBs. Toutefois, certains congénères tels que les PCBs 118, 153 et 180, substitués en 2, 4, 5, sont réfractaires à toute tentative de métabolisation en raison de la position de leurs atomes de chlore. Cela amène donc inévitablement à une accumulation dans les organismes contaminés (Kannan *et al.*, 1995 ; Bright *et al.*, 1995 cités dans Bodin, 2005). Aussi, la métabolisation des PCBs diminue avec l'augmentation du nombre d'atomes de chlore présents, ainsi qu'avec la diminution du nombre d'atomes de carbone adjacents qui sont non substitués.

L'organe majoritairement impliqué dans ce processus est le foie. On distingue 2 phases dans le mécanisme de biotransformation :

▪ *Réaction de phase I :*

Les mécanismes impliqués dans les réactions de phase I sont des hydroxylations et des oxydoréductions. Des molécules telles que les PCBs subissent essentiellement des hydroxylations. Le plus important système catalysant ces processus est la grande famille d'isoenzymes hématiques cytochrome P450 (CYP).

La réaction de base est une monooxygénation qui se fait via des monooxygénases se trouvant au niveau du réticulum endoplasmique (Figure I.5). Le fonctionnement du cytochrome P450 nécessite la présence d'une enzyme associée, la cytochrome P450 réductase, qui prélève deux électrons à une flavoprotéine réduite pour les transférer au substrat qui sera oxydé. La flavoprotéine elle-même reçoit ses électrons du NADPH + H<sup>+</sup>.



Il existe un grand nombre d'isoenzymes du cytochrome P450, classées en familles désignées par les chiffres 1, 2, 3 ..., et par les lettres A, B, C ..., chaque famille métabolisant préférentiellement des substrats déterminés (Tableau I.2).

Les isoenzymes capables de métaboliser le phénobarbital (isoenzymes PB-type) métabolisent également les PCBs non dioxin-like (Harper *et al.*, 2006). Les molécules de type « PB » induisent les cytochromes P450-2B1, 2B2 et 3A. Les PCBs dioxin-like activent quant à eux



des isoenzymes capables de métaboliser le 3-méthylcholanthrène (isoenzymes MC-type). Ces molécules induisent les CYP-1A1 et 1A2 (Okey *et al.*, 2005). Les mixtures de PCBs tel que l'Aroclor 1254, induisent à la fois les monooxygénases MC- et PB-type.

▪ *Réaction de phase II :*

Les réactions de phase II sont des réactions de conjugaison. Elles impliquent plusieurs types de métabolites endogènes qui peuvent former des conjugués avec les toxiques ou avec les métabolites issus de la première phase. Les conjugués résultants seront généralement plus hydrosolubles et plus facilement excrétés.

Cette étape peut se faire grâce à la présence d'enzymes de conjugaison comme les glutathion-S-transférases (GSTs), les glucuronyl transférases, les époxydes transférases ou encore les sulfotransférases (Leguen *et al.*, 2000).

1.3.3.2. Le récepteur Ah et l'induction du cytochrome P450-1A1

Les polychlorobiphényles, les polychlorodibenzodioxines, dont la 2,3,7,8 tetrachlorodibenzo-*p*-dioxine (TCDD) et d'autres PHAHs se lient au récepteur AhR, également connu sous le nom de récepteur de la dioxine. Ces substances chimiques sont appelées « ligands AhR ». Cependant, aucun d'entre eux ne peut être considéré comme physiologique. Par contre, plusieurs composés endogènes, comme la bilirubine et des dérivés de tryptophane, ont été isolés et définis comme étant des ligands naturels pour l'AhR (Kawajiri *et al.*, 2007).

Le récepteur Ah régule 2 réponses face aux xénobiotiques : (1) l'induction du CYP-1A1 et des enzymes apparentées, et (2) la toxicité des composés « dioxin-like » (Harper *et al.*, 2006). En régulant les enzymes impliquées dans le processus de biotransformation, l'AhR est associé à une fonction adaptative importante. En plus de sa fonction comme récepteur des xénobiotiques, l'AhR joue de multiples rôles dans la biologie cellulaire fondamentale, le développement de l'organisme et sa physiologie (Harper *et al.*, 2006 ; Kawajiri *et al.*, 2007).

De nombreuses études ont montré que le CYP1A1 est induit après exposition aux PCBs. Il est d'ailleurs considéré comme un biomarqueur d'exposition chez plusieurs organismes (Tilley *et al.*, 2002 ; Jelaso *et al.*, 2005).

▪ Mécanisme d'action du récepteur Ah

Le récepteur Ah est présent sous une forme soluble dans le cytoplasme des cellules de presque tous les vertébrés. En absence de ligand, l'AhR est séquestré dans ce compartiment via un complexe de molécules chaperonnes dont les hsp 90 (heat shock protein), qui sont des molécules liées au stress (Hahn, 1998 ; Puga *et al.*, 2005). Une fois le complexe ligand/AhR formé, il y a dissociation des hsp90 et changement de conformation du récepteur. Le complexe est alors transporté dans le noyau par association avec une protéine nucléaire de translocation (ARNT ou AhR nuclear translocator). Le dimère formé, attaché à son ligand, peut alors se fixer en amont des gènes cibles sur une séquence spécifique : le Xenobiotic Responsive Element (XRE). Cette séquence se trouve au niveau du promoteur du gène codant pour le cytochrome P450-1A1. Il y aura alors activation de la transcription de ce gène (Figure I.6) (Hahn, 1998).

Parmi la centaine de gènes cibles identifiés, les CYP-1A1, CYP-1A2 et CYP-1B1 (gènes de phase I) occupent une place de choix étant donné leur implication dans le métabolisme des xénobiotiques. Des gènes tels que ceux codant pour la glutathion-S-transférase sont également fortement ciblés.

## 2. La métamorphose et le développement des amphibiens anoures

### 2.1. La métamorphose

La métamorphose est une crise morphogénétique qui a lieu au cours de la vie post-embryonnaire d'un animal. Chez les amphibiens, seuls les anoures sont concernés par ce phénomène ; le développement des urodèles, dont la forme adulte est morphologiquement similaire à la forme larvaire, est beaucoup moins spectaculaire. Ce processus complexe qu'est la métamorphose fait intervenir des changements cellulaires et tissulaires aussi différents que la différenciation, l'apoptose ou la morphogenèse (Bertrand & Laudet, 2001).

D'un point de vue général, la métamorphose se déroule comme suit : les branchies et la queue disparaissent, tandis que les membres antérieurs et les poumons se forment ; les glandes cutanées se développent et les structures sensibles, appelées lignes latérales, dégénèrent.

Parallèlement, des modifications biochimiques ont lieu, notamment au niveau de l'hémoglobine qui acquiert sa forme adulte. L'hémoglobine du têtard a une plus grande affinité pour l'oxygène que celle de la grenouille adulte grâce à la présence d'un nombre moins important de groupements SH disponibles dans la partie globine de la molécule (Shi, 2000 ; Weber, 1996 cité dans Veldhoen *et al.*, 2002).

La métamorphose des anoures conduit à des changements qui vont transformer un têtard herbivore et aquatique en une grenouille adulte, carnivore et adaptée à la vie terrestre. Cet événement est divisé en 3 périodes principales : la prémétamorphose, la prométamorphose et le climax métamorphique (Shi, 2000 ; Nakajima *et al.*, 2005 ; Zhang *et al.*, 2006).

#### 2.1.1. La prémétamorphose

La prémétamorphose réfère à la période de l'embryogenèse et à la période larvaire post-embryonnaire durant laquelle le têtard est en croissance et en développement, sans modification morphologique apparente (Figure I.7). Il y a apparition des bourgeons des membres, d'abord postérieurs, ensuite antérieurs. Les bourgeons augmentent de taille avec la croissance du têtard.

Cette étape se déroule en l'absence des hormones thyroïdiennes (THs) (Figure I.8) (Nakajima *et al.*, 2005). Cependant, l'expression des transcrits codant pour la protéine de liaison à l'hormone augmente durant cette période, peut-être en préparation à l'augmentation subséquente des niveaux de THs (Veldhoen *et al.*, 2002). Le têtard est donc capable de répondre à des hormones thyroïdiennes endogènes mais a une thyroïde non fonctionnelle à ce stade (Zhang *et al.*, 2006).

#### 2.1.2. La prométamorphose

Durant la prométamorphose, la morphogenèse est accélérée en réponse aux quantités croissantes de triiodothyronine (T3) endogène (Figure I.8) (Nakajima *et al.*, 2005). La différenciation et la morphogenèse des membres se produisent à ce moment (Figure I.7) (Becker *et al.*, 1997 ; Shi, 2000 ; Veldhoen *et al.*, 2002).

#### 2.1.3. Le climax métamorphique

Le climax métamorphique est la période durant laquelle les THs endogènes sont à leurs niveaux les plus élevés. A ce moment, des changements métamorphiques rapides se mettent en place (Figure I.8) (Shi, 2000 ; Veldhoen *et al.*, 2002 ; Nakajima *et al.*, 2005 ; Helbing *et al.*,

2006). La modification la plus remarquable durant cette période est la résorption complète de la queue du têtard au stade 66 de la métamorphose (Figure I.7). En plus des changements externes, des transformations internes drastiques prennent place. C'est le cas notamment de l'intestin qui se raccourcit ; ou encore du passage de l'ammoniotélisme à l'uréotélisme ...

Après le climax, la concentration en hormones thyroïdiennes endogènes descend ensuite à un niveau très bas, mais mesurable, chez la jeune grenouille (Cai et Brown, 2004).

## **2.2. La glande thyroïde et la métamorphose**

### **2.2.1. Les hormones thyroïdiennes**

Les hormones thyroïdiennes sont les agents qui contrôlent la métamorphose des amphibiens. Comme tout autre processus de développement, la métamorphose est également sous l'influence d'autres hormones. Certaines d'entre elles proviennent de l'hypophyse, comme par exemple la Thyroid Stimulating Hormone (TSH), et des glandes surrénales (les corticostéroïdes), et peuvent accélérer ou inhiber le processus en fonction du type d'hormone, du type tissulaire et du stade de développement de l'animal (Shi, 2000).

Il existe 2 hormones thyroïdiennes naturelles ; la 3,5,3',5'-tetraiodothyronine (T4) communément appelée thyroxine, et la 3,5,3'-triiodothyronine (T3), qui sont des dérivés iodés<sup>530</sup> d'un acide aminé : la thyrosine (Figure I.9). La biosynthèse des 2 hormones implique d'abord l'activation de la transcription du gène de la thyroglobuline au niveau de la glande thyroïde, organe diffus se trouvant au niveau de la mâchoire inférieure des têtards (Figure I.10). Le produit de cette transcription, la thyroglobuline, subit ensuite une série de modifications post-traductionnelles, incluant une iodation, afin de produire la T4. Une fois formée, la T4 peut alors être sécrétée dans le plasma ou convertie en T3 par déiodation via l'action de deux isoenzymes, les 5'-déiodinases de type I et II (Köhrle, 1999).

Les niveaux plasmatiques en T3 augmentent durant la métamorphose et atteignent un pic au climax métamorphique (Figure I.8). Les niveaux en corticostéroïdes, hormones produites par les glandes surrénales, augmentent également et sont en synergie avec la T3 (Denver, 1998). Alors que cette dernière est le stimulus majeur de la métamorphose, la prolactine pituitaire (PRL) semble exercer des actions anti-métamorphiques (Nicoll *et al.*, 1965, Dodd et Dodd, 1976 cités dans Shi, 2000). Paradoxalement, il a été observé que la production de PRL est faible durant la pré- et prométamorphose et ses niveaux augmentent ensuite pour atteindre une valeur maximale au climax métamorphique (Figure I.11). Un mécanisme potentiel d'action de la prolactine serait de bloquer le récepteur des hormones thyroïdiennes. Au climax métamorphique, elle servirait à contrecarrer les fortes concentrations en THs afin de permettre une coordination des transformations séquentielles des différents organes ou tissus (Denver, 1998 ; Shi, 2000).

### **2.2.2. Implication de l'axe hypothalamo-hypophysaire**

Les changements anatomo-physiologiques qui ont lieu lors de la métamorphose sont contrôlés par l'axe endocrinien hypothalamo-hypophyso-thyroïdien (Figure I.12).

La synthèse des THs est sous le contrôle de l'hypothalamus. Pendant la croissance, ce dernier est peu développé. Le cerveau exerce donc peu de contrôle sur l'hypophyse. En absence de régulation hypothalamique, l'adénohypophyse sécrète peu ou pas de TSH. Cette hormone hypophysaire transite par voie sanguine jusqu'à la glande thyroïde où elle va stimuler la

production de T4. Pendant la croissance du têtard en prémétamorphose, la concentration en hormones thyroïdiennes est donc très faible<sup>2</sup>.

Le régulateur neurohormonal de la sécrétion de TSH chez les mammifères est la Thyrotropin Releasing Hormone (TRH). Dans le cerveau du têtard en métamorphose, la TRH ne semble pas contrôler la sécrétion de la thyroïde. Ce serait plutôt le Corticotropin Releasing Factor (CRF) qui constituerait le facteur contrôlant et libérant la TSH chez les larves d'amphibiens.

Lorsque l'hypothalamus se développe, la sécrétion de CRF par ce dernier provoque donc une augmentation de la sécrétion de TSH qui elle-même, active la production de T3 et T4<sup>2</sup> (Manzon et Denver, 2004). Les hormones thyroïdiennes, alternativement, exercent un rétro-contrôle négatif classique sur l'hypophyse pour réduire la libération de TSH.

### 2.2.3. Mécanismes d'action des hormones thyroïdiennes

Les tissus larvaires présentent une sensibilité variable aux hormones thyroïdiennes. Ainsi, la T3 stimule la croissance des pattes postérieures, mais induit l'histolyse de la queue du têtard.

L'action des THs est régulée à de multiples niveaux durant le développement. Cette régulation est en partie due à la présence de nombreuses protéines de liaison aux THs dans le plasma, le cytosol et le noyau. Aussi, les événements biologiques liés aux THs sont principalement médiés par la régulation de la transcription de gènes cibles via l'intermédiaire des récepteurs nucléaires aux hormones thyroïdiennes.

#### 2.2.3.1. Les protéines de liaison des hormones thyroïdiennes

Bien qu'elles soient lipophiles et donc capables de traverser les membranes par simple diffusion, les hormones thyroïdiennes sont transportées de façon active à travers les membranes plasmique et nucléaire.

Les protéines sériques de liaison des THs comme la transthyrétine (TTR), servent de transporteurs pour amener celles-ci aux tissus cibles. La TTR lie préférentiellement la T4 chez les mammifères (Köhrle, 1999 ; Lehigh Shirey *et al.*, 2006). Par contre, chez les amphibiens, elle a une plus grande affinité pour la T3 (Prapunpoj *et al.*, 2000 ; Lehigh Shirey *et al.*, 2006).

A l'intérieur du cytoplasme, les THs rencontrent un autre groupe de protéines de liaison, les Thyroid Hormone Binding Proteins (THBPs) (Yamauchi *et al.*, 1998 ; Cheng, 1991 cité dans Shi, 2000). Les THBPs sont en fait des transthyréтины amphibiennes (Yamauchi *et al.*, 1998). En général, ces protéines sont multifonctionnelles et ont aussi d'autres rôles dans le cytoplasme.

#### 2.2.3.2. Les récepteurs des hormones thyroïdiennes

Les récepteurs des hormones thyroïdiennes (TRs) appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires. La T3 est la forme qui a la plus grande affinité pour ces récepteurs. Une fois liés, il y a modulation de la transcription de divers gènes spécifiques. Les TRs sont donc des facteurs de transcription dont l'activité est dépendante de la liaison à leurs ligands.

Après formation d'hétérodimères avec un autre récepteur nucléaire, le récepteur de l'acide rétinoïque 9-*cis* (RXR), les complexes TR/RXR se fixent sur des éléments de réponse à la thyroïde (TREs) situés dans les régions promotrices des gènes ciblés (Sachs *et al.*, 2000 ; Bertrand & Laudet, 2001). En présence d'hormone, les hétérodimères TR-RXR activent la

<sup>2</sup> <http://membres.lycos.fr/carcinus/ECOPHYSIOLOGIE/METAMORPHOSE/metam7.htm>

transcription de leurs gènes cibles alors qu'en leur absence, ils la répriment (Bertrand & Laudet, 2001).

Les récepteurs nucléaires partagent plusieurs caractéristiques structurales. En général, chacun peut être divisé en 5 domaines (A/B, C, D, E et F). Le domaine de liaison à l'ADN est le domaine C qui sert à la reconnaissance des TREs. Celui de liaison à l'hormone est le E. Cette région est impliquée dans la régulation transcriptionnelle et la dimérisation du récepteur. Entre ces 2 domaines de liaison, on trouve le domaine D qui renferme un signal de localisation nucléaire des récepteurs. La région F n'est quant à elle pas toujours présente et joue un rôle moins bien défini. Enfin, la région A/B est une région d'activation ou de modulation transcriptionnelle (Figure I.13) (Shi, 2000 ; Cayrou, 2003).

Les récepteurs des hormones thyroïdiennes sont codés par 2 gènes différents, TR $\alpha$  et TR $\beta$ , chacun étant associé à des fonctions spécifiques. La présence de TR $\alpha$  est requise pour que la métamorphose du têtard puisse se produire (Veldhoen *et al.*, 2002). Les niveaux d'ARNm de TR $\alpha$  subissent une augmentation aux alentours du stade 44 (prémétamorphose) chez *Xenopus laevis*. A ce stade du développement, plusieurs tissus et organes (dont le cerveau) programmés pour subir des changements majeurs durant la métamorphose, montrent des niveaux élevés en ARNm des TRs (Sachs *et al.*, 2000 ; Tata, 2006). Après le stade 54 et jusqu'à la fin de la métamorphose, il y a corrélation entre l'augmentation des transcrits des TRs et le niveau circulant d'hormone thyroïdienne T4 chez les têtards (Figure I.14) (Nakajima *et al.*, 2005 ; Tata, 2006).

Les quantités relatives des ARNm de TR $\alpha$  et  $\beta$  varient en fonction des zones et tissus ciblés ; TR $\beta$  est plus fortement exprimé dans la région de la tête et voit son niveau d'expression augmenter au cours de la métamorphose (Figure I.14) (Tata, 2006 ; Hogan *et al.*, 2007).

### 2.2.3.3. Les déiodinases I, II et III.

La voie majeure de production de la T3 se fait par déiodation de la T4 par des déiodinases. Il existe 3 sortes de déiodinases, dont la 5'-déiodinase I (DI-1) qui est présente dans le foie, la glande thyroïde, le système nerveux central et l'hypophyse. La DI-1 va métaboliser la T4 inactive en T3 active (Guiguère, 1998). L'enzyme n'est cependant pas présente chez les têtards de *Xenopus laevis* où l'activité de production de T3 est médiée par la déiodinase de type 2 (DI-2) exclusivement (Galton, 1988 cité dans Lehigh Shirey *et al.*, 2006).

La DI-2 se trouve essentiellement dans le cerveau et l'hypophyse (Leonard, 1994 cité dans Guiguère, 1998), et plus particulièrement au niveau des ventricules (Cai et Brown, 2004). Elle est responsable de la production locale de T3 par les cellules gliales et par les astrocytes dans le cerveau (Guadaño-Ferraz *et al.*, 1999). La DI-2 est présente constitutivement dans les tissus qui subissent la métamorphose avant que les niveaux en THs n'augmentent. Par contre, l'expression de la DI-2 est induite par les hormones thyroïdiennes pour les tissus qui se métamorphosent plus tardivement durant le développement, (Cai et Brown, 2004 cité dans Lehigh Shirey *et al.*, 2006).

La 5-déiodinase de type III (DI-3) se trouve également dans le cerveau où elle inactive les hormones thyroïdiennes en convertissant la T3 en une molécule inactive, la 3,3'-diiodothyronine (T2), et en transformant la T4 en une forme inactive de T3, la reverse-T3 (r-T3) (Figure I.15) (Lehigh Shirey *et al.*, 2006 ; Brown et Cai, 2007).

#### 2.2.3.4. Les mécanismes de régulation transcriptionnelle par les TRs

Les TRs activent ou répriment la transcription de certains gènes cibles dans les tissus et cellules (Sachs *et al.*, 2000). Ces différents gènes renferment un ou plusieurs TRE(s) qui consistent souvent en une répétition d'une séquence consensus AGGTCA (Naar *et al.*, 1991, Umesono *et al.*, 1991 cités dans Sachs *et al.*, 2000 ; Buchholz *et al.*, 2006). Ils peuvent être réprimés ou activés par les hétérodimères TR/RXR en fonction de l'absence ou de la présence des hormones thyroïdiennes. Quand RXR et TR sont présents, la transcription des gènes inductibles par les THs est réprimée. Un apport de T3 active la transcription (Buchholz *et al.*, 2006).

Différents cofacteurs sont recrutés par les TRs pour effectuer la régulation transcriptionnelle. Il existe des corépresseurs qui peuvent interagir avec les complexes TR/RXR non liés à la TH. En absence d'hormone thyroïdienne, TR/RXR se lie à un TRE et recrute au niveau du gène cible un complexe qui contient une déacétylase. C'est le cas de N-CoR lié à Sin-3A et RPD3, RPD3 étant l'histone déacétylase. Ce groupe d'acteurs provoque une déacétylation localisée de l'histone et induit la répression de la transcription (Figure I.16) (Sachs *et al.*, 2000).

Il existe également des coactivateurs, qui eux, interagissent avec les complexes TR/RXR liés à l'hormone thyroïdienne. On note par exemple le coactivateur CBP/p300 lié à SRC1 et p/CAF qui sont des histones acétylases. Le complexe corépresseur est rejeté et le coactivateur est recruté. Il y a alors acétylation de l'histone et activation de la transcription (Figure I.16) (Sachs *et al.*, 2000 ; Buchholz *et al.*, 2006).

Chez le têtard en développement, la fonction du complexe TR/RXR est double. En effet, l'hétérodimère TR/RXR fonctionne comme répresseur transcriptionnel de gènes induits par la TH quand celle-ci est absente chez les têtards en prémétamorphose, et comme activateur transcriptionnel durant la métamorphose, quand la TH est présente (Sachs *et al.*, 2000).

### 2.3. Le remodelage tissulaire pendant la métamorphose

#### 2.3.1. Introduction

Le processus post-embryonnaire qu'est la métamorphose transforme systématiquement la plupart des organes du têtard en leurs formes adultes. En parallèle, la métamorphose mène au développement d'organes qui fonctionnent exclusivement chez la grenouille adulte.

On distingue 3 types majeurs de changements qui se déroulent durant la métamorphose :

Premièrement, il y a résorption complète des organes spécifiques du têtard qui, par définition, sont éliminés durant la métamorphose. C'est le cas de la queue et des branchies. Les cellules subissent une mort cellulaire programmée ou apoptose, avec des changements morphologiques séquentiels distincts étant donné la dégradation de la matrice extracellulaire par différents types d'enzymes (par exemple, les métalloprotéases (MMPs) avec, entre autres, la collagénase 3) (Shi, 2000 ; Bertrand & Laudet, 2001).

Deuxièmement, il y a développement d'organes spécifiques de la grenouille. On a, par exemple, apparition des membres postérieurs qui se développent à partir de cellules non différenciées de la colonne vertébrale (Shi, 2000).

Enfin, le remodelage partiel mais profond d'organes existants comme le foie et le système rénal, avec la transition de l'ammoniotélisme à l'uréotélisme suite à la reprogrammation du profil d'expression de gènes des hépatocytes existants (Shi, 2000). L'intestin est également remodelé car chez les anoures, le climax métamorphique s'accompagne d'un changement de régime alimentaire (Figure I.17).

### 2.3.2. Morphogenèse du système nerveux central

L'embryon sur le point de neuruler s'allonge suivant l'axe antéropostérieur et s'aplatit dorsalement. La neurulation coïncide avec la formation du système nerveux. Son ébauche commence dans la région dorsale de l'embryon. La première étape consiste en l'épaississement de l'épithélium neuroectodermique qui dessine une plaque neurale bordée par deux renflements : les bourrelets neuraux, entre lesquels se crée une dépression en forme de U, la gouttière neurale. Dans une deuxième étape, la plaque neurale, sous l'influence de mouvements morphogénétiques, se referme sur elle-même : les bourrelets neuraux se soulèvent puis se rapprochent l'un de l'autre, s'attouchent et fusionnent (Hemmati-Brivanlou, 2000). La soudure prend naissance dans la région troncale et progresse rapidement vers la région postérieure et plus lentement vers la région céphalique. Enfin, l'achèvement de la soudure des bourrelets neuraux conduit à la formation du tube neural qui s'internalise sous l'épiderme dorsal (Figure I.18). La neurulation ne se produit donc pas simultanément sur toute la longueur de l'embryon<sup>3</sup> (Delaune, 2005).

On distingue la région céphalique antérieure vésiculaire ainsi que la région troncale tubulaire. Elles sont respectivement à l'origine du cerveau et de la moelle épinière et délimitent donc les futures régions de la tête et du tronc. Le développement ultérieur du tube neural conduit à la formation du système nerveux central. Des changements locaux se produisent. Dans la portion céphalique, le tube neural se resserre en deux endroits et délimite trois vésicules primaires : le prosencéphale, le mésencéphale et le rhombencéphale. Postérieurement, le tube neural demeure un simple tube qui s'amincit dans la région caudale et formera la moelle épinière.

Par constriction, le rhombencéphale se subdivise en deux : le myélencéphale et le métencéphale. Le myélencéphale deviendra la moelle allongée. Le métencéphale quant à lui, donnera naissance au cervelet. Enfin, le prosencéphale se sépare en deux par constriction pour donner naissance au diencéphale et au télencéphale. Le diencéphale formera le thalamus, le sous-thalamus, l'hypothalamus et l'épithalamus. Le télencéphale donnera naissance aux hémisphères cérébraux<sup>4</sup> (Figure I.19).

### 2.3.3. Le remodelage du système nerveux

#### 2.3.3.1. Morphologie et histologie du système nerveux central

Le système nerveux central subit une réorganisation étendue durant la métamorphose. Les régions associées à de nouveaux organes ou tissus, comme les membres, se développent, alors que celles connectées aux tissus et organes larvaires, comme la queue, dégénèrent.

Au niveau morphologique, certains changements incluent le raccourcissement du diencéphale (Shi, 2000). Dans le cervelet, l'évènement métamorphique majeur est l'apparition d'une épaisse couche cellulaire granuleuse externe, certaines de ces cellules migrent au-delà des cellules de Purkinje et se différencient en neurones dans la couche granuleuse interne définitive (Figure I.20) (Gona *et al.*, 1988 cité dans Shi, 2000 ; Cayrou, 2003 ; Koibuchi et Iwasaki, 2006).

Au niveau histologique, un des changements les plus importants est la mort des cellules de Mauthner (paire de neurones géants impliqués dans le fonctionnement de la queue) et des neurones sensoriels et motoneurones qui alimentent les muscles de la queue (Hoskins, 1990 ; Denver *et al.*, 1997 ; Denver, 1998). On assiste également à la disparition des cellules Rohon-

---

<sup>3</sup>Mapageweb.umontreal.ca/cabanat/bio2460/organo1.html ;

www.snv.jussieu.fr/bmedia/xenope1/organogenese/Organogenese.htm

<sup>4</sup> www.snv.jussieu.fr/bmedia/xenope1/organogenese/Organogenese.htm

Beard (cellules mécanosensorielles innervant la peau de la queue) durant la métamorphose, bien que certaines d'entre elles dégèrent durant les stades prémétamorphiques. Les cellules de Purkinje, éléments centraux du réseau synaptique cortical du cervelet, subissent un processus de maturation avec l'acquisition d'arbres dendritiques élaborés (Gona *et al.*, 1988 cité dans Shi, 2000). En parallèle, les neurones de la rétine apparaissent dans le diencéphale (Denver *et al.*, 1997).

Plusieurs autres types de neurones, incluant les neurones moteurs de la colonne et les neurones ganglionnaires de la racine dorsale, prolifèrent d'abord durant la fin de la prémétamorphose et au début de la prométamorphose. Certains d'entre eux mûrissent ensuite ou se différencient, alors que d'autres meurent (Shi, 2000).

D'autres changements incluent le développement du cervelet, des noyaux mésencéphaliques du nerf trijumeau et des connexions entre la colonne vertébrale et les membres (Denver *et al.*, 1997 ; Denver, 1998).

#### 2.3.3.2. Variation de l'expression des gènes

La métamorphose du cerveau de l'amphibien implique l'élimination sélective de certaines cellules larvaires par mort cellulaire, et le développement de tissus adultes par prolifération et différenciation cellulaires.

Les gènes impliqués dans la fonction cérébrale dont l'expression est régulée par la T3 durant le développement sont regroupés en 3 classes : la première inclut les gènes qui commencent à être transcrits durant la prométamorphose et qui continuent à être exprimés à des niveaux élevés chez la grenouille. La deuxième classe de gènes regroupe ceux qui sont transcrits en même temps que la première classe mais qui sont ensuite réprimés en fin de métamorphose. La dernière classe concerne les gènes qui sont exprimés à des niveaux élevés seulement pendant le climax métamorphique (Denver *et al.*, 1997).

Suite à l'autoinduction de TR $\beta$  par la T3, une série de changements dans l'expression de différents gènes impliqués dans le remodelage du cerveau se produit et conduit à la transformation des tissus larvaires en tissus adultes. Chez des têtards de *Xenopus laevis*, 20 heures après une exposition à la T3, 34 ADNc correspondant à des ARNm régulés par la T3 ont été isolés dans le diencéphale de têtards en prémétamorphose. Sur les 34 séquences identifiées, 13 correspondent à des gènes dont l'expression est régulée par la T3 et ce, uniquement dans le cerveau (Denver *et al.*, 1997 ; Denver, 1998).

#### 2.3.3.3. Les hormones thyroïdiennes et le système nerveux

En plus d'induire des changements métamorphiques chez les amphibiens, les hormones thyroïdiennes sont nécessaires pour la neurogenèse et pour tous les processus concernés par la maturation du système nerveux central, et ce chez tous les vertébrés (Helbing *et al.*, 2006). En effet, les THs influencent le développement de structures neurosécrétrices dans le diencéphale, et peuvent donc exercer une influence positive sur la production ultérieure d'hormones. L'éminence médiane est la structure contenant les terminaisons nerveuses neurosécrétrices qui sont en contact avec les capillaires sanguins drainant les vaisseaux portes de l'hypophyse. Cette structure est essentielle pour la libération des neurohormones par l'hypophyse, et son développement durant la prométamorphose est dépendant de la T3 (Denver, 1998).



De plus, une thyroïdectomie ou une hypophysectomie chez des têtards de *Xenopus laevis* résulte en une plus grande taille des ventricules et en des parois plus fines du cervelet et de la medulla oblongata comparés à ceux des animaux contrôles métamorphosés (Kollros, 1981 cité dans Shi, 2000). D'un autre côté, un traitement à la T3 de têtards prémétamorphiques mène à une métamorphose précoce du cerveau (Gona *et al.*, 1988, Hoskins, 1990 cités dans Shi, 2000).

### 3. Effets toxiques des PCBs

#### **3.1. Impact des PCBs sur les amphibiens**

Il existe peu d'études relatant des effets des PCBs sur les amphibiens lors d'expositions chroniques. Les études de contamination à court terme sont quant à elles plus fréquentes et leurs effets sont donc mieux connus. Le tableau I.3 les synthétise.

##### **3.1.1. Effets des PCBs sur le développement et la métamorphose**

Des études menées par Gutleb *et al.* (2000) rendent les PCBs responsables d'altérations au niveau du développement des amphibiens. Ces altérations dépendent principalement de la concentration en PCBs utilisée ainsi que de la durée de contamination. Lors d'une exposition à long terme, des malformations au niveau des yeux et de la queue ont été mises en évidence. En parallèle, une diminution du poids du corps et une augmentation de la durée de la période larvaire et de la mortalité ont été relevées. De plus, les niveaux en T4 sont moins élevés chez les têtards exposés aux PCBs en comparaison aux contrôles, ce qui peut expliquer l'allongement de la période larvaire.

Un an plus tard, Glennemeier et Denver (2001) ont fait les mêmes observations concernant un retard de la métamorphose. Ils ont mis en évidence une diminution des niveaux du contenu basal en corticostérone dans l'ensemble du corps des têtards exposés aux PCBs.

Zhou *et al.* (2004) ont montré que les PCBs n'altèrent pas significativement le succès d'éclosion des œufs des grenouilles vertes *Rana clamitans* et des grenouilles léopards *Rana pipiens* exposés à 50 µg/l de PCB126<sup>5</sup>. Il n'y a pas non plus de différences significatives en ce qui concerne les malformations et la mortalité des jeunes embryons exposés à de l'Aroclor 1254 durant 96 heures. Par contre, une contamination de têtards se trouvant aux stades 46/47 durant 96 heures, a des effets délétères beaucoup plus importants ; il y a diminution du taux de survie avec l'augmentation de la durée d'exposition et de la concentration en PCBs.

Plus récemment, Lehigh Shirey *et al.* (2006) ont montré que les PCBs retardent de façon significative la métamorphose. Cette équipe a montré que le retard de la métamorphose des amphibiens se fait par l'intermédiaire de variations de l'expression de gènes liés au système thyroïdien (DI-2, DI-3 et TTR). Ils ont également mis en évidence une diminution de l'expression de gènes codant pour les déiodinases de type 2 et 3 chez des têtards exposés à 50 ppb d'Aroclor 1254, ce qui induit une chute significative de la déiodation de la T4 en T3. Des études faites par Huang *et al.* (2001) ont montré que la durée de la métamorphose est contrôlée par l'activité de la DI-2 dans les tissus cibles et une surexpression de la DI-3 inhibe la métamorphose.

---

<sup>5</sup> Le PCB 126 est un congénère de PCBs, non-ortho substitué.

Enfin, les PCBs induisent une augmentation de l'expression des gènes codant pour la TTR qui est, comme susmentionné, un transporteur de la T4. Les PCBs et leurs métabolites hydroxylés (OH-PCBs) entrent en compétition avec la T4 pour la liaison au TTR et dans certains cas délient l'hormone qui y est attachée (Lans *et al.*, 1993, Purkey *et al.*, 2004 cités dans Lehigh Shirey *et al.*, 2006).

### 3.1.2. Effets des PCBs sur le comportement et la morphologie

Le comportement d'un individu influence très fortement sa croissance et sa survie. Jung et Jagoe (1995) ont remarqué des plus faibles vitesses de nage et une susceptibilité à la prédation par les tritons plus importante suite à des changements au niveau du comportement des têtards se trouvant en présence de polluants.

Glennemeier et Denver (2001) ont observé que des têtards de *Rana pipiens* exposés au 77-TCB<sup>6</sup> passent plus de temps au repos et moins de temps à se nourrir que les têtards non exposés. De plus, on remarque que les réponses compétitives des têtards de *Rana pipiens* et de la grenouille des bois *Rana sylvatica* sont fortement diminuées quand les têtards sont nourris avec de la nourriture traitée aux PCBs.

D'un point de vue morphologique, lors d'une exposition orale à long terme avec du PCB126 ou de l'Aroclor 1254, on constate l'apparition d'une dépigmentation de la peau des individus (Gutleb *et al.*, 2000 ; Zhou *et al.*, 2004). Celle-ci étant dépendante de la dose de PCBs appliquée.

### 3.1.3. Effets des PCBs sur l'expression de gènes

Jelaso *et al.* (2005) ont montré que des changements dans l'expression de gènes pouvaient servir de biomarqueurs d'exposition aux PCBs chez les têtards de *Xenopus laevis*.

En 2003, cette équipe avait déjà montré que l'exposition à de faibles concentrations d'Aroclor 1254 (5 et 50 ppb) durant 2 jours et ce, 18 jours post-fécondation (PF), augmente l'expression de certains gènes, dont le NGF (Nerve Growth Factor), jouant des rôles importants dans la physiologie et le développement. Cette variation d'expression se produisait indépendamment de l'apparition d'effets néfastes observables ou de changements à long terme. Le NGF est un facteur qui joue un rôle important dans le cerveau de l'embryon. Il régule la croissance, la différenciation et la survie des neurones en développement (Jelaso *et al.*, 2002) ainsi que la réponse neurale aux dommages à la fois dans le système nerveux en développement et adulte (Jelaso *et al.*, 2005). Un déficit dans l'expression de NGF pourrait jouer un rôle dans les déficits neurodéveloppementaux induits par les PCBs (Jelaso *et al.*, 2002).

Par contre, à de fortes doses d'Aroclor 1254 (300 et 400 µg/l), Jelaso *et al.* (2003) observaient une diminution de l'expression de ces mêmes gènes en corrélation avec une diminution de la survie et avec la présence d'anomalies morphologiques chez les têtards exposés. On note par exemple la présence de scolioses irréversibles au niveau de la queue (Figure I.21), ce qui altère la nage et résulte, dans certains cas, en des paralysies.

## 3.2. Les PCBs et la neurotoxicité

Un certain nombre de congénères de PCBs sont connus pour être neurotoxiques (les PCBs coplanaires, notamment les congénères 77 et 126 ; et les *ortho*-substitués avec par exemple les PCBs 118 et 153 principalement) (Cravedi et Narbonne, 2002 ; Malkiewicz *et al.*, 2006) ;

<sup>6</sup> Le 77-TCB (3,3',4,4'-tetrachlorobiphényle) est un congénère de PCBs.

l'exposition à ces substances est souvent associée à des changements cognitifs et comportementaux, ainsi qu'à des déficits neurodéveloppementaux et neurologiques. L'exposition péri- et postnatale implique des effets neurotoxiques variés chez les organismes, les principaux ayant été compilés par Giesy et Kannan (2002). Ils sont présentés en annexe à titre d'information.

Historiquement, deux évènements impliquant une surexposition directe de personnes aux PCBs via de la nourriture contaminée ont permis d'ouvrir les yeux sur la dangerosité et les effets neurotoxiques des PCBs. Le premier de ces accidents s'est produit à Yusho, au Japon, en 1968. Le deuxième a eu lieu à Taiwan en 1979 (Yu-Cheng). Dans les 2 cas, les manifestations cliniques associées à cette exposition incluaient différentes plaintes somatiques, un faible poids et une hyperpigmentation des nouveau-nés, ainsi que la présence massive de chloracné (Ross, 2004). Les enfants nés de mères exposées avaient de moins bonnes fonctions intellectuelles que des enfants nés de mères non exposées (Yu *et al.*, 1991). Ces 2 incidents ont permis de mettre en évidence la forte sensibilité du système nerveux en développement à certains contaminants environnementaux (Giesy et Kannan, 2002).

Suite à ces observations, des chercheurs se sont penchés sur les effets neurodéveloppementaux d'une exposition environnementale aux PCBs. Une étude réalisée en Caroline du Nord a montré que des enfants exposés aux PCBs avaient un tonus diminué et de moins bons réflexes à la naissance que des enfants moins exposés. Les enfants exposés avaient un développement moteur plus lent et un déficit de la mémoire visuelle et de la mémoire à court terme (Rogan et Gladen, 1992). Dans une étude impliquant des enfants nés de mères qui consomment beaucoup moins de poissons du lac Michigan, l'équipe du docteur Jacobson a mis en évidence une relation inverse entre l'exposition prénatale aux PCBs et la reconnaissance visuelle du nourrisson (Jacobson *et al.*, 1985 ; Jacobson *et al.*, 1990). Des effets semblables ont été mis en lumière par Huisman *et al.* (1995). L'équipe hollandaise a découvert qu'il existait une relation inverse entre la teneur en PCBs dans le lait maternel et un développement neurologique optimal de l'enfant. Une relation entre les PCBs et une fonction intellectuelle diminuée a aussi été identifiée (Jacobson & Jacobson, 1996 ; Patandin *et al.*, 1999).

Des études cliniques et épidémiologiques menées chez des enfants fortement exposés aux PCBs ont également révélé des diminutions du quotient intellectuel (QI), des capacités mnésiques et d'apprentissage, des fonctions neuromusculaires ainsi que des capacités visuelles et de reconnaissance d'objet (Cravedi et Narbonne, 2002). De plus, ils sont plus susceptibles aux phénomènes de dépression, d'agression et d'hyperactivité.

Une telle exposition conduit chez les nouveaux-nés à une baisse des activités psychomotrices et de moins bonnes performances dans l'acquisition des connaissances chez les enfants de moins de 4 ans. Par contre, les effets sont peu ou pas significatifs lorsque l'exposition a eu lieu au cours de l'allaitement (Cravedi et Narbonne, 2002).

L'équipe de Schantz (2001) a mis en évidence chez les adultes une corrélation positive entre la teneur en PCBs dans le tissu adipeux et la diminution des performances de mémorisation. Cette corrélation existe aussi entre l'exposition des adultes aux PCBs et le rétrécissement de leur champ de vision, la diminution de la perception des couleurs, une moins bonne mémorisation du langage et une capacité auditive réduite (Kilburn, 2000 cité dans Cravedi et Narbonne, 2002).

### 3.3. La neurotoxicité médiée par une altération des hormones thyroïdiennes

L'hormone thyroïdienne d'origine maternelle est importante avant et après la naissance, pour le développement du cerveau du fœtus ainsi que pour le devenir neurologique de l'enfant. Des facteurs environnementaux qui affecteraient la fonction de la thyroïde de la mère, ou l'action directe de l'hormone thyroïdienne, pourraient donc provoquer des dégâts importants chez l'enfant (Zoeller *et al.*, 2002). Il est bien connu qu'une déficience en THs durant la période périnatale induit, chez l'homme, un développement anormal du cerveau connu sous le nom de crétinisme. L'hypothyroïdisme durant cette période cause une diminution de la croissance axonale et de l'arborisation dendritique dans le cortex cérébral, visuel et auditif, l'hippocampe et le cervelet chez le rat (Figure I.22) (Rabie & Legrand, 1973, Rabie *et al.*, 2001 cités dans Iwasaki *et al.*, 2002).

Une exposition aux PCBs durant la période prénatale induit un développement anormal du cerveau, similairement à celui vu chez des patients hypothyroïdiens. Il a donc été suggéré que l'interférence des PCBs avec le développement du cerveau peut se produire via une perturbation des niveaux en THs. Par conséquent, l'expression des gènes régulés par ces hormones peut s'en trouver affectée. Des animaux de laboratoire exposés en période prénatale aux PCBs ont des problèmes neurologiques semblables à ceux rencontrés par des animaux hypothyroïdiens (Koibuchi et Chin, 2000).

Les mécanismes d'action des PCBs ne sont pas encore clairement identifiés. On sait cependant que les PCBs ont une influence sévère au niveau de l'organisme et qu'ils altèrent fortement le système thyroïdien. Tous les congénères de PCBs sont capables de réduire les niveaux circulants de T4 par divers mécanismes (Zoeller *et al.*, 2002). Tout d'abord, certaines formes hydroxylées de PCBs (substitués en *méta* et en *para*) ont une haute affinité pour les protéines de liaison à la T4 (Portefield, 2000). La T4 est capable de traverser la barrière sang/cerveau grâce à la présence de ces protéines. Le congénère lié à l'une d'entre elles pourra alors traverser cette barrière et s'accumuler dans le cerveau (Iwasaki *et al.*, 2002). L'interférence avec le système thyroïdien peut donc se faire à travers l'inhibition de la liaison de la T4 à ces protéines mais aussi par action directe sur la glande thyroïde (Hauser *et al.*, 1998 ; Portefield et Hendry, 1998 ; Portefield, 2000). De plus, certains congénères de PCBs hydroxylés, ressemblant à la T3 et à la T4, ont une plus haute affinité pour la liaison aux TTRs. Ils y agiront comme agonistes ou antagonistes (Portefield, 2000).

La T3 transmet son signal par liaison aux TRs qui sont des facteurs de transcription induits par leurs ligands et qui régulent des gènes cibles. A cause des similarités de structures entre les THs et les PCBs, la liaison compétitive des PCBs aux TRs a également été avancée (McKinney, 1989 cité dans Iwasaki *et al.*, 2002). Les PCBs coplanaires ou mono-*ortho* substitués suppriment ainsi la transcription médiée par les TRs dans une série de cellules (Simon *et al.*, 2007).

Ils suppriment également la transcription médiée par SRC-1, suggérant que les PCBs pourraient affecter le complexe coactivateur incluant ce facteur (Iwasaki *et al.*, 2002). Notons que SRC-1 est abondamment exprimé dans le cerveau comparé aux autres activateurs. Les PCBs pourraient agir directement sur le TR pour supprimer l'action de SRC-1 dans le système nerveux central. L'effet des PCBs pourrait donc être plus important dans le système nerveux central que dans les autres organes.

Des études menées par Byrne *et al.* (1987) ont montré que l'exposition à des PCBs diminue la capacité de la TSH à augmenter la concentration en T4 *in vivo*. Donc, les PCBs peuvent interférer directement avec la thyroïde.

Enfin, d'autres observations mentionnent une augmentation du taux d'élimination de thyroxine et de T3 sériques dans la bile (Portefield, 2000) ; une diminution des activités sulfotransférases hépatiques chargées de la conjugaison des THs ; une diminution des activités déiodinases cérébrales impliquées dans la synthèse de T3 ; une atteinte du transport sérique de la thyroxine... (Cravedi et Narbonne, 2002).

#### 4. Intérêt d'une approche combinée génomique - protéomique

La génomique est subdivisée en 2 grands domaines : la génomique structurale qui caractérise la nature physique de génomes entiers (établissement de cartes génomiques, séquençage, localisation des gènes sur les chromosomes), et la génomique fonctionnelle qui étudie la fonction des gènes, leur expression et leur régulation ainsi que les interactions entre gènes.

L'analyse des changements qui existent au niveau de l'expression de gènes semble être une approche idéale pour déceler la présence de stress environnementaux. Le premier niveau d'expression de ces gènes est l'ARNm. Celui-ci sera d'abord transcrit à partir de l'ADN et ensuite traduit en protéine. Les études sur l'ARNm n'apportent pas d'information en ce qui concerne la modification post-traductionnelle des protéines qui pourrait grandement affecter leur fonction (Shrader *et al.*, 2003). D'un autre côté, les protéines ne peuvent pas nous donner d'information sur la régulation des gènes.

Il est donc utile de pouvoir combiner à la fois l'approche transcriptomique et l'approche protéomique (Figure I.23) afin de mieux comprendre le fonctionnement de la régulation et de l'expression des gènes.

##### 4.1. L'approche transcriptomique

Le transcriptome est l'ensemble des ARNm issus de l'expression d'une partie du génome d'un tissu ou d'un type cellulaire. L'analyse et la quantification du transcriptome permettent, dans un tissu et dans des conditions donnés, d'identifier des changements dans l'expression des gènes et de déterminer les mécanismes de régulation de leur expression. Cependant, tous les changements dans les mécanismes cellulaires ne peuvent pas être mesurés. C'est le cas notamment de modifications des protéines ou de la redistribution subcellulaire de celles-ci, événements qui peuvent se produire dans un organisme en réponse à un stimuli, et qui ne nécessitent pas l'expression de gènes (Heijne *et al.*, 2005).

Une des techniques utilisées pour mesurer simultanément le niveau d'expression d'un grand nombre de types différents d'ARNm est celle de la puce à ADN (ou DNA microarray) (Figure I.24). Les microarrays ont l'avantage de disposer de collections de fragments de gènes dont la séquence est connue. Des informations concernant leur fonction au sein de la cellule sont également souvent disponibles.

Cependant, les microarray peuvent aussi contenir des fragments d'ADN pour lesquels la fonction n'a pas encore été déterminée (Heijne *et al.*, 2005). Dans la plupart des cas, les niveaux d'expression dans un échantillon test sont comparés avec les niveaux d'une référence ou d'un échantillon contrôle.

##### 4.2. L'approche protéomique en écotoxicologie

Le protéome désigne l'ensemble des protéines exprimées par le génome. Toutes les cellules de l'organisme possèdent le même génome, mais ont un protéome différent selon le tissu ou l'organe, ainsi que le moment du développement de l'organisme. La protéomique permet d'avoir une vue d'ensemble du fonctionnement du génome au niveau cellulaire, tissulaire ou

au niveau d'un organe. Elle permet d'identifier et de quantifier les protéines exprimées par une cellule à un moment donné, offrant la possibilité d'assigner une fonction à un phénomène biologique donné (Bandara et Kennedy, 2002). Ici, contrairement à la transcriptomique, les modifications post-traductionnelles et les complexes protéiques peuvent être visualisés (Heijne *et al.*, 2005).

Les techniques actuelles concernant l'analyse et la séparation des protéines permettent d'étudier simultanément des milliers de protéines. La principale utilisée est la technique fluorescente 2D-DIGE (*two dimension difference in-gel electrophoresis*) qui permet de quantifier des spots de protéines de 2 échantillons différents. La mesure du protéome est plus complexe que celle du transcriptome. En effet, la séparation des protéines d'une cellule ou d'un échantillon est une tâche difficile, puisque toutes les protéines ont des propriétés différentes, notamment au niveau de leur masse, de leur point isoélectrique, de leur solubilité et de leur stabilité.

La « toxicoprotéomique » permet d'analyser les effets de stress environnementaux qui résultent de la contamination du milieu sur l'expression des protéines au sein de l'organisme. Les études réalisées en toxicoprotéomique font partie de la protéomique comparée. En effet, une comparaison des différents gels correspondant aux différentes conditions expérimentales doit être réalisée afin d'en ressortir les protéines dont l'expression a été modifiée.

La plupart des recherches utilisant l'approche protéomique ont été menées dans les domaines pharmaceutique et médical, notamment en toxicologie ainsi que dans la découverte et le développement de médicaments. Très peu d'études écotoxicologiques ont utilisé cette approche. Certaines d'entre elles utilisent l'analyse protéomique pour mettre en évidence des profils d'expression de protéines induits suite à une exposition à un xénobiotique donné. Cela permet ainsi de caractériser au niveau protéomique les modifications occasionnées par ce polluant. Les recherches de Shepard *et al.* (2000), ont montré l'existence de profils d'expression de protéines qui sont différents selon les conditions expérimentales et qui sont spécifiques d'un stress particulier. Un peu plus tard, Silvestre *et al.* (2006) réussirent à mettre en évidence des profils d'expression de protéines induits chez le crabe chinois suite à une exposition au cadmium. Pour ce faire, ils ont utilisé la technique des gels bidimensionnels colorés à l'argent. Ceux-ci ont permis de mettre en évidence la sur- ou sous-expression d'un total de 34 spots dans les branchies antérieures de crabes chinois soumis à une exposition aiguë (0,5 mg/l de cadmium, durant 3 jours) ou chronique (50 µg/l de cadmium, durant 30 jours). Plus récemment, Apraiz *et al.* (2006) identifièrent à l'aide de l'analyse protéomique, chez les moules (*Mytilus edulis*), des signatures caractéristiques d'une exposition à trois polluants marins : le diallyl phtalate, le bisphénol A et le PBDE-47. Ils ont obtenu 111 spots qui montraient des variations significatives de leur niveau d'expression chez les groupes exposés aux polluants, parmi lesquels ils identifièrent une seule et unique signature d'exposition pour chacun des composés chimiques. Ce type d'étude suggère que les signatures protéomiques pourraient constituer des outils utiles dans le cadre de la surveillance de la présence de polluants dans l'environnement. Des études supplémentaires menées sur les protéines sur- ou sous-exprimées identifiées pourraient fournir une information cruciale quant à la compréhension des mécanismes de toxicité de xénobiotiques (Apraiz *et al.*, 2006).

## 5. Objectifs

La pollution de notre environnement par des substances nocives est devenue, comme mentionné précédemment, un problème majeur et d'intérêt croissant. De nombreuses recherches étudiant les effets à court terme de doses élevées de polluants ont été menées sur divers organismes (invertébrés, amphibiens, rongeurs,...). Cependant, les effets de contaminations chroniques, notamment aux PCBs, sur l'organisme en développement sont peu étudiés et donc peu connus. On sait pourtant que c'est durant cette période que les organismes sont les plus fragiles et les plus vulnérables.

De nombreuses recherches menées sur les amphibiens ont permis de mettre en évidence des modifications du taux de survie, de la croissance et de la morphologie des têtards suite à une exposition à des xénobiotiques, dont les PCBs. D'autres études se sont tournées vers l'analyse du contenu en hormones thyroïdiennes. En effet, il a été montré que les événements biologiques liés aux THs sont principalement médiés par la régulation de la transcription de gènes cibles via l'intermédiaire des récepteurs nucléaires aux hormones thyroïdiennes. Des changements dans les concentrations en THs produits en réponse à des modifications de l'environnement pourraient donc avoir un impact sur l'expression de certains gènes.

De plus, il a été mis en évidence que les hormones thyroïdiennes exercent un rôle très important dans le développement du cerveau et du système nerveux périphérique chez les vertébrés. Il a été montré qu'une déficience en THs durant la vie fœtale ou néonatale produisait de nombreux déficits neurodéveloppementaux. Parallèlement, les scientifiques ont démontré qu'une exposition aux PCBs durant la période prénatale induit un développement anormal du cerveau, similairement à celui vu chez des patients hypothyroïdiens. Il a donc été suggéré que l'interférence des PCBs avec le développement du système nerveux central peut se produire via une perturbation des niveaux en THs. Il est connu également que les PCBs affectent l'expression de certains gènes et en conséquence la traduction de ces derniers en protéines.

L'objectif général de ce travail est d'étudier les effets des PCBs sur le développement larvaire des amphibiens aux niveaux morphologique (mise en évidence de malformations), biochimique (mesure des concentrations en hormones thyroïdiennes dans divers organes) et, principalement, protéomique. Dans cette étude, les effets d'une contamination chronique, avec de faibles doses de PCBs (0,1, 1 et 10 ppb), de têtards de *Xenopus laevis* en développement sont investigués. En raison des observations évoquées ci-dessus, le cerveau a été choisi comme organe cible pour l'analyse la plus importante de ce travail : la protéomique. Cette technique a été peu utilisée en écotoxicologie jusqu'à présent. Cependant, il est intéressant de pouvoir superposer cette approche complémentaire aux études de transcriptomique existantes. Nous tenterons de déceler des modifications, par la technique du 2D-DIGE, des niveaux d'expression des protéines au sein du cerveau de têtards, et ce pour différentes doses de PCBs reçues. De plus, un dosage des hormones thyroïdiennes T3 et T4 sera réalisé dans le cadre d'une étude préliminaire.

Enfin, une approche supplémentaire par spectrométrie de masse sera menée afin d'identifier un ensemble de protéines sur- et/ou sous-exprimées de manière significative et reflétant la réponse à la contamination. Une importante recherche bibliographique tentera ensuite de mettre en évidence le rôle de ces protéines et leur relation avec le processus de métamorphose et avec le fonctionnement du système nerveux central en général. Nous essaierons également de déterminer s'il existe une interaction entre les hormones thyroïdiennes et ces protéines.

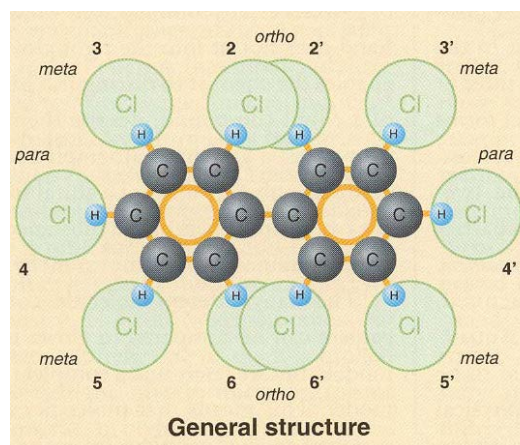
Catégorie	Nom	Particularité
<b>Production non-intentionnelle</b> (sous-produit de réaction)	Dioxines	Sous-produit de combustion ou d'autres procédés industriels
	Furannes	
	Hydrocarbures polycycliques aromatiques	
	Hexachlorobenzène	
<b>Produits chimiques industriels</b>	Polychlorobiphényles	Utilisés comme isolant électrique, fluide caloporteur, additif dans les peintures et plastiques
	Hexachlorocyclohexane	Produit intermédiaire de l'industrie chimique
	Hexachlorobenzène	Utilisé dans la fabrication de munitions et de caoutchouc
<b>Pesticides</b>	Hexachlorobenzène	Fongicide
	Endrine	Insecticides
	Aldrine	
	Dieldrine	
	Toxaphène	
	Mirex	
	Chlordane	
	Chlordécone	
	Heptachlore	
	DDT	
	Lindane	

**Tableau I.1:** Répartition des 16 POPs définis par le protocole d'Aarhus ([http://www.ain.fr/vivre/environnement/plan-dechets/pdf/2006\\_04\\_reglementation.pdf](http://www.ain.fr/vivre/environnement/plan-dechets/pdf/2006_04_reglementation.pdf)).

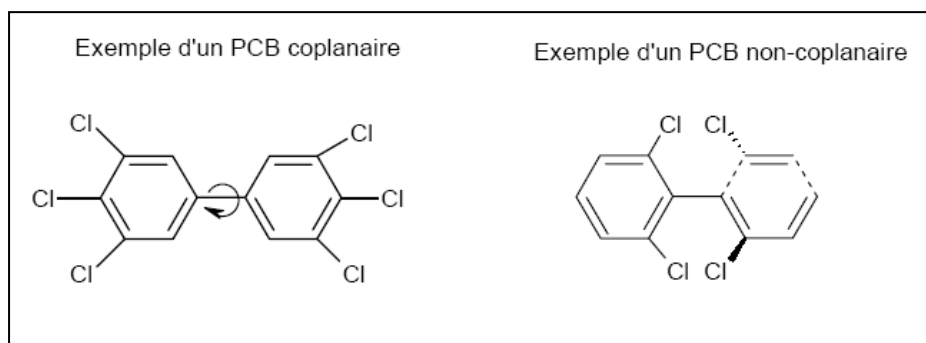
Le [protocole d'Aarhus](#) a été signé en juin 1998 dans le cadre de la Convention de Genève sur la Pollution Transfrontalière Longue Distance, sous l'égide de la Commission Economique des Nations Unies pour l'Europe (CEE-NU). L'objet de ce protocole est de contrôler, de réduire ou d'éliminer les émissions de 16 de ces substances dans l'environnement. Les POPs d'origine industrielle visés par ce texte sont les dioxines / furannes, les polychlorobiphényles (PCBs) et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs).

La [convention de Stockholm](#) a été signée en mai 2001 dans le cadre du Programme des Nations Unies pour l'Environnement (PNUE). L'objet de cette convention est de contrôler, de réduire ou d'éliminer les émissions de 12 de ces substances dans l'environnement. Les POPs d'origine industrielle visés par ce texte sont les dioxines / furannes, les PCBs et l'hexachlorobenzène (HCB).





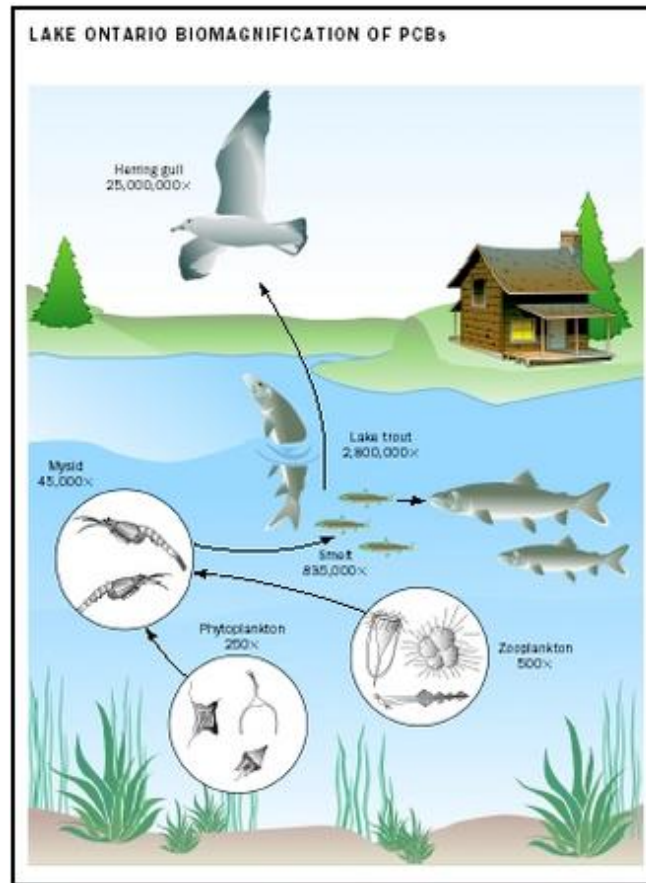
**Figure I.1 :** Structure générale des PCBs  
(<http://www.aquadocinter.hu/themes/Dioxin/Dioxin20030703.htm>).



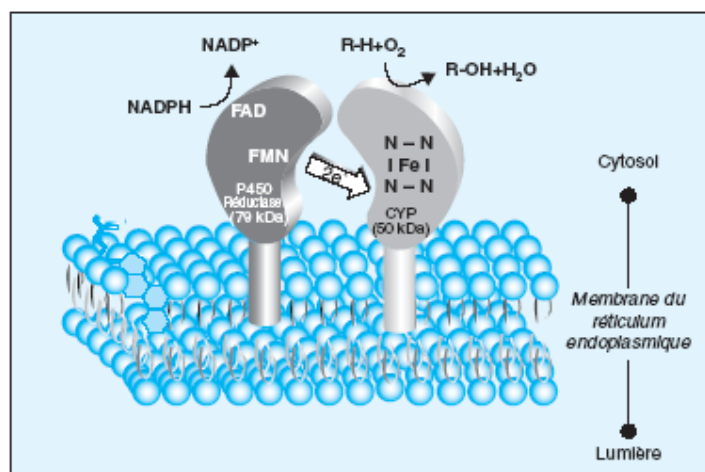
**Figure I.2 :** Structure des PCBs coplanaires et non-coplanaires  
([http://atctoxicologie.free.fr/archi/bibli/les\\_dioxines.pdf](http://atctoxicologie.free.fr/archi/bibli/les_dioxines.pdf)).



**Figure I.3 :** Structures voisines des dioxines (dont la 2,3,7,8-TCDD) et des PCBs « dioxine-like» (Bodin, 2005).



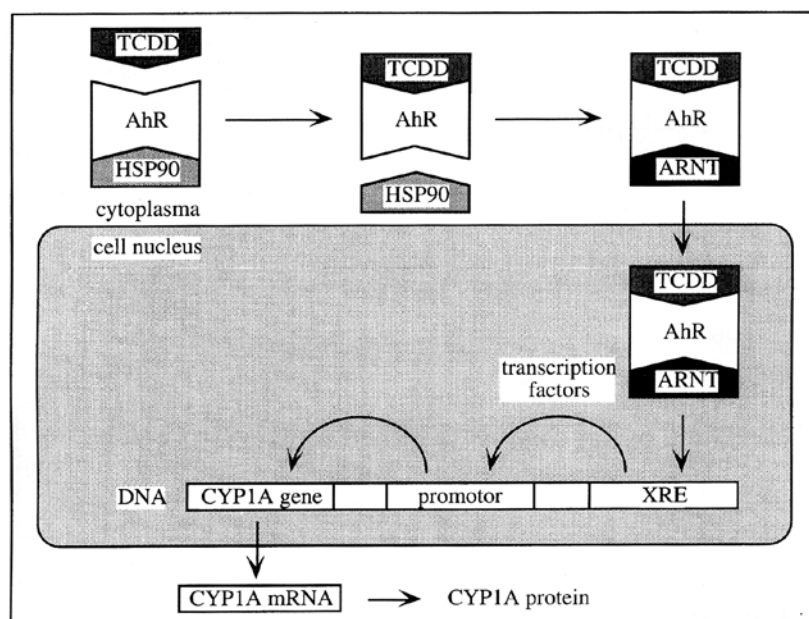
**Figure I.4 :** Bioamplification des PCBs dans l'écosystème du lac Ontario.  
 ([http://www.pollutionissues.com/images/paz\\_01\\_img0027.jpg](http://www.pollutionissues.com/images/paz_01_img0027.jpg)).



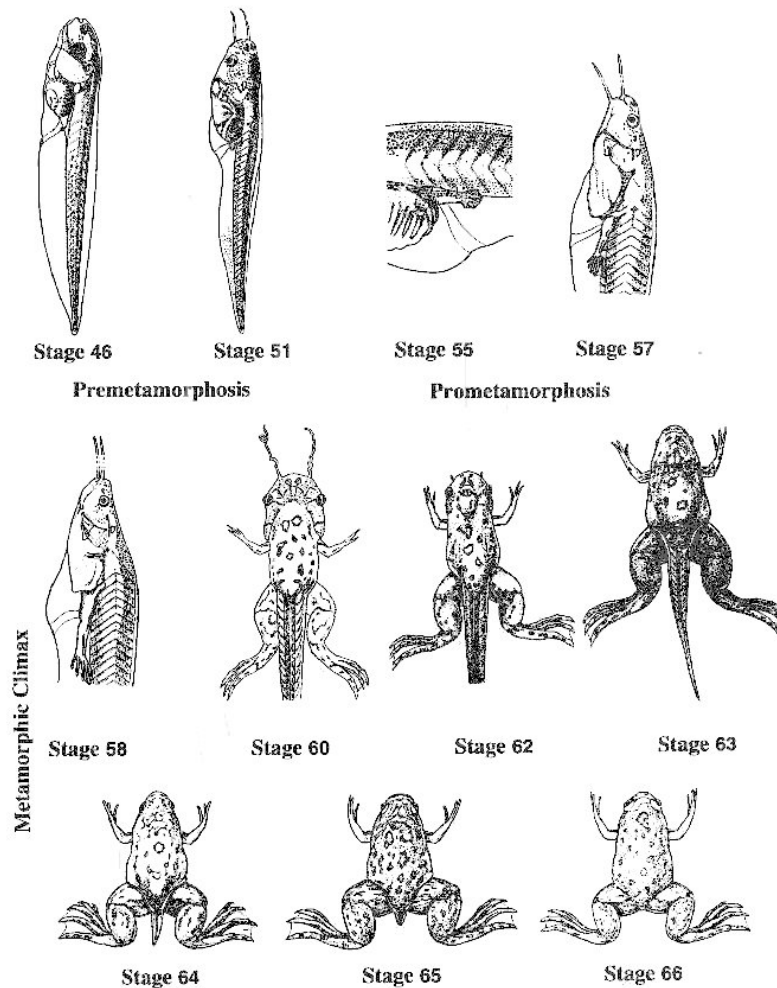
**Figure I.5 :** Localisation membranaire des cytochromes P450 dans le réticulum endoplasmique. La transformation d'un composé chimique par les enzymes à cytochromes P450 a lieu sur la face externe du réticulum endoplasmique où est ancrée l'enzyme. Le site actif du cytochrome P450 contient un atome de fer (Fe). Deux électrons, provenant d'une molécule de NADPH, sont transférés à l'hémoprotéine par une flavoprotéine (FAD-FMN) en présence d'une molécule organique (R-H) et d'un atome d'oxygène. Le composé organique est oxydé et un atome d'oxygène est incorporé au produit chimique (R-OH). R : médicaments, acides gras, stéroïdes, polluants (Guéguen *et al.*, 2006)

Cytochrome P450	Fonctions métaboliques
CYP1	Métabolisme des xénobiotiques et des stéroïdes
CYP2	Métabolisme des xénobiotiques et des stéroïdes
CYP3	Métabolisme des xénobiotiques et des stéroïdes
CYP4	Métabolisme des acides gras, eicosanoïdes, acide arachidonique et médicaments
CYP5	Thromboxane A2 synthase
CYP7	Synthèse des acides biliaires
CYP8	Synthèse des acides biliaires, prostacycline synthase
CYP11	Stéroïdogénèse
CYP17	Stéroïde 17-alpha hydroxylase
CYP19	Aromatase (synthèse des œstrogènes)
CYP21	Stéroïdogénèse, stéroïde 21-hydroxylase
CYP24	Dégradation de la vitamine D, vitamine D-24 hydroxylase
CYP26	Hydroxylation de l'acide rétinolique
CYP27	Synthèse des acides biliaires, hydroxylations de la vitamine D3
CYP39	7α-hydroxylation du 24S-hydroxycholestérol
CYP46	Cholestérol 24S-hydroxylase
CYP51	Lanostérol 14-alpha déméthylase (biosynthèse du cholestérol)

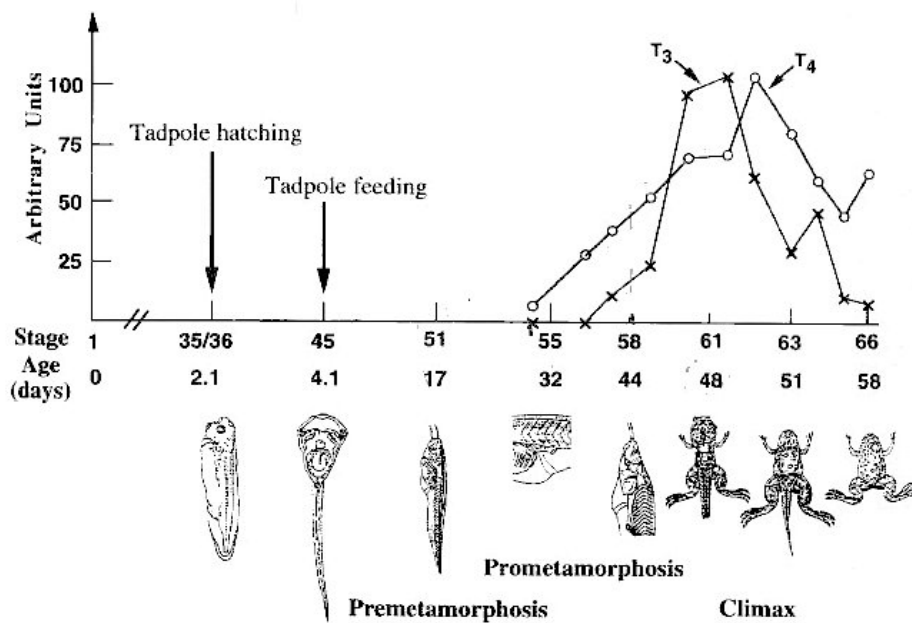
**Tableau I.2 :** Fonctions métaboliques des cytochromes P450 (Guéguen *et al.*, 2006).



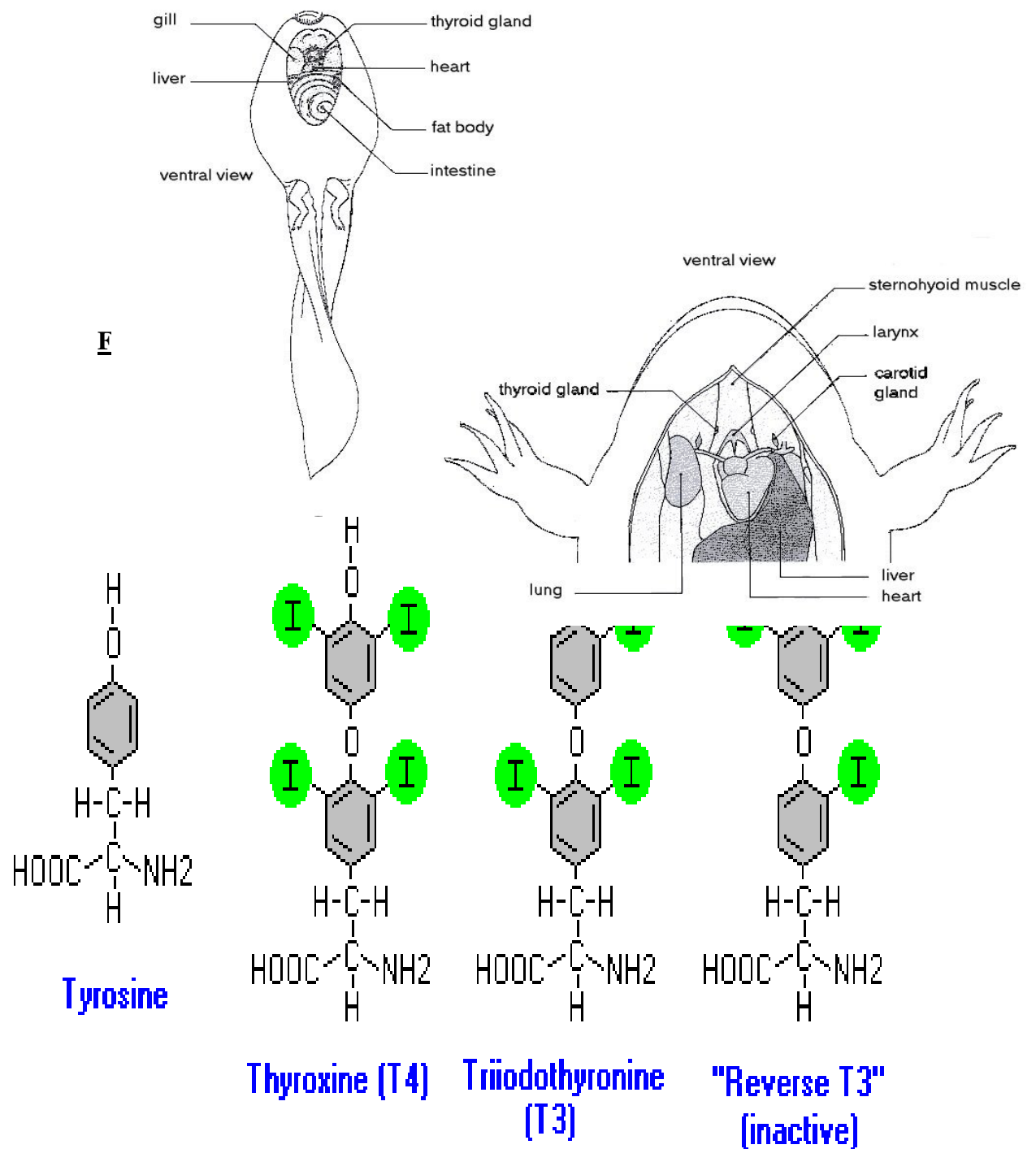
**Figure 1.6 :** Mécanisme d'induction du CYP-1A (Bucheli et Fent, 1995).



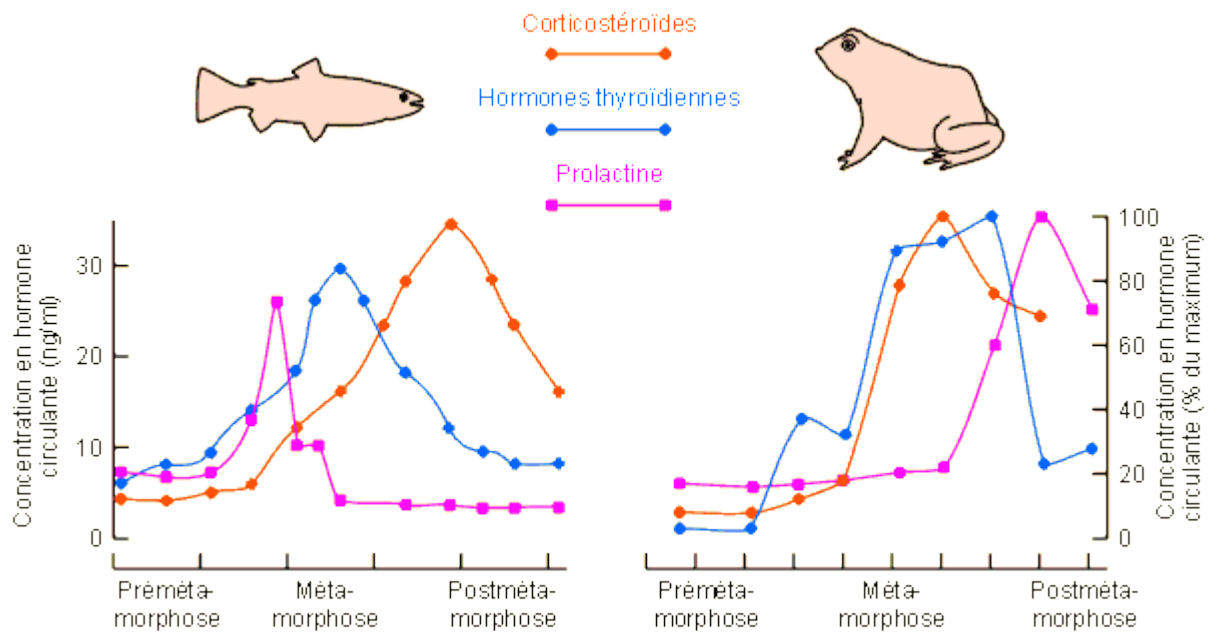
**Figure I.7 :** Représentation des étapes de développement des têtards de *Xenopus laevis* selon Niewkoop et Faber, 1956 (Shi, 2000).



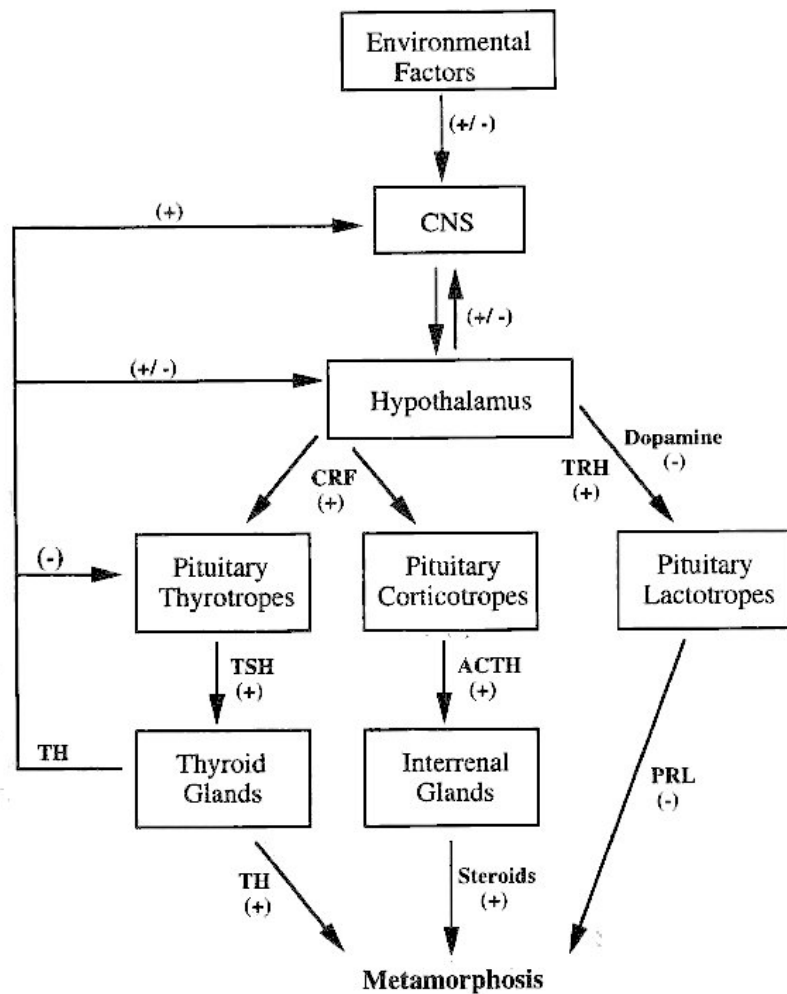
**Figure I.8 :** Corrélation entre la concentration des hormones thyroïdiennes T3 et T4 dans le plasma et la métamorphose chez *Xenopus laevis* (Shi, 2000).



**Figure I.10 :** Glande thyroïde chez le têtard (à gauche) et la grenouille (à droite) (Matsumoto et Ishii, 1992).

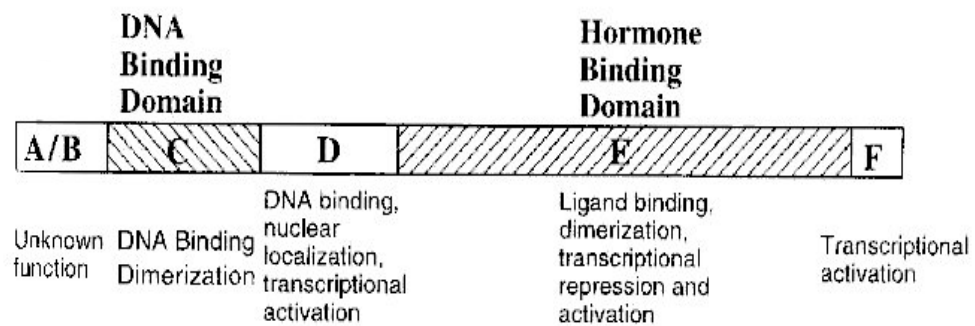


**Figure I.11 :** Changements hormonaux accompagnant le processus métamorphique chez les poissons (smoltification du saumon) et les batraciens (<http://coproweb.free.fr/pagphy/physioan/ch9s2b.htm#2.3.5.c>).

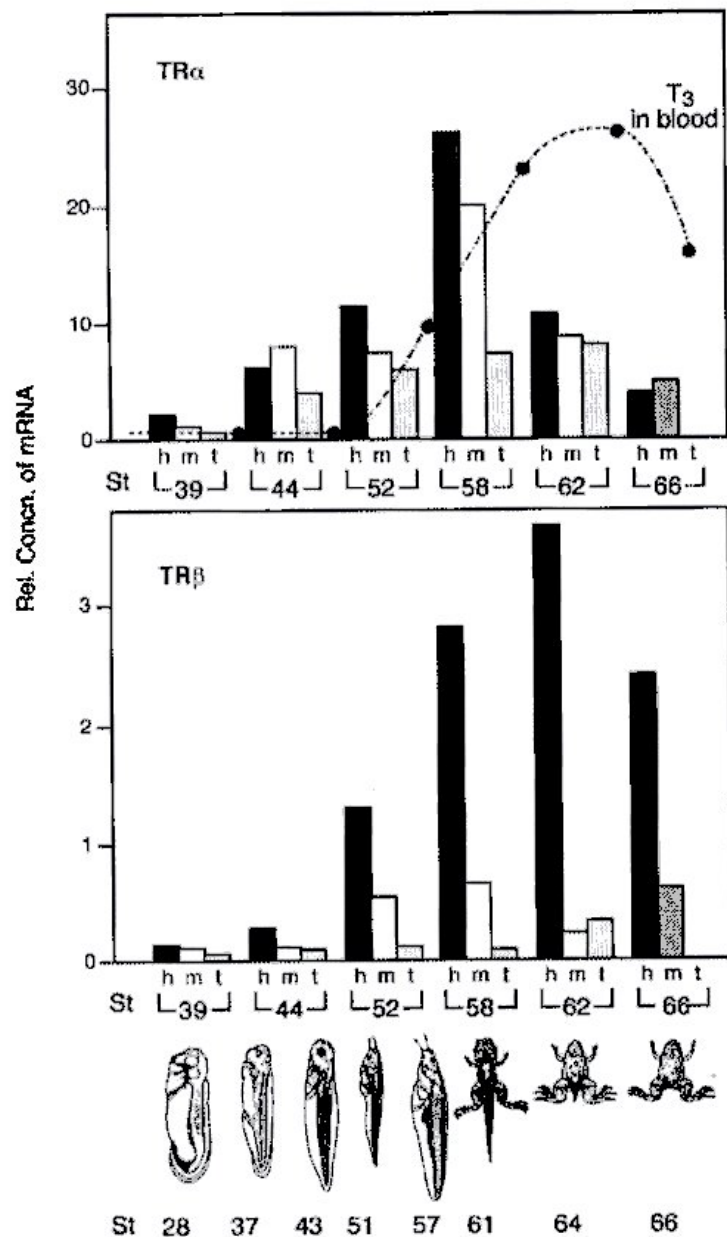


**Figure I.12 :** Représentation des voies hormonales qui affectent la métamorphose des amphibiens. Un signe + indique une action positive ou stimulatrice et un signe – indique une action négative ou inhibitrice. Les THs et les stéroïdes (corticostéroïdes) exercent des effets positifs sur la métamorphose alors que la prolactine l’inhibe. Leur synthèse et sécrétion sont sous la régulation neuroendocrine complexe impliquant à la fois des feedbacks positifs et négatifs. CNS, central nervous system ; CRF, corticotropin releasing factor ; TRH, thyrotropin-releasing hormone ; TSH, thyrotropin ; ACTH, adrenocorticotropin ; TH, thyroid hormone ; PRL, prolactine (Shi, 2000).

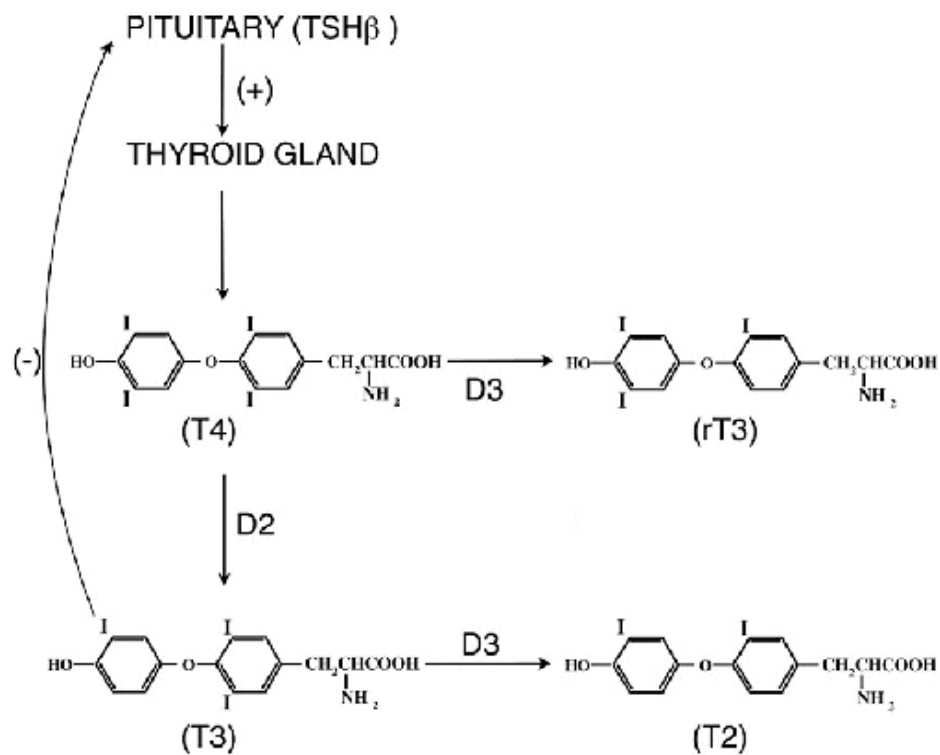




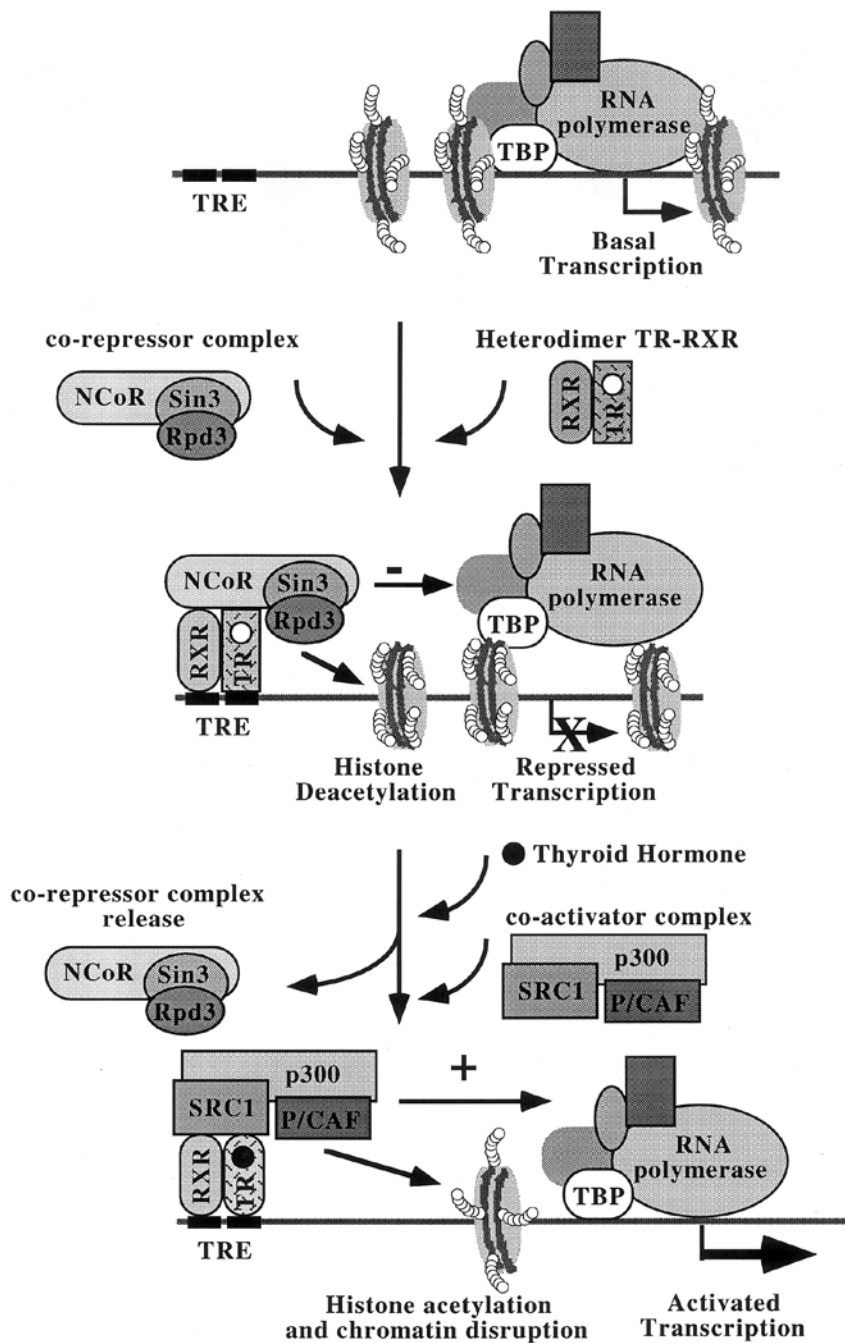
**Figure I.13 :** Structure et fonction des domaines des TRs. Le domaine A/B a des propriétés d'activation de la transcription pour un certain nombre de récepteurs nucléaires (Shi, 2000).



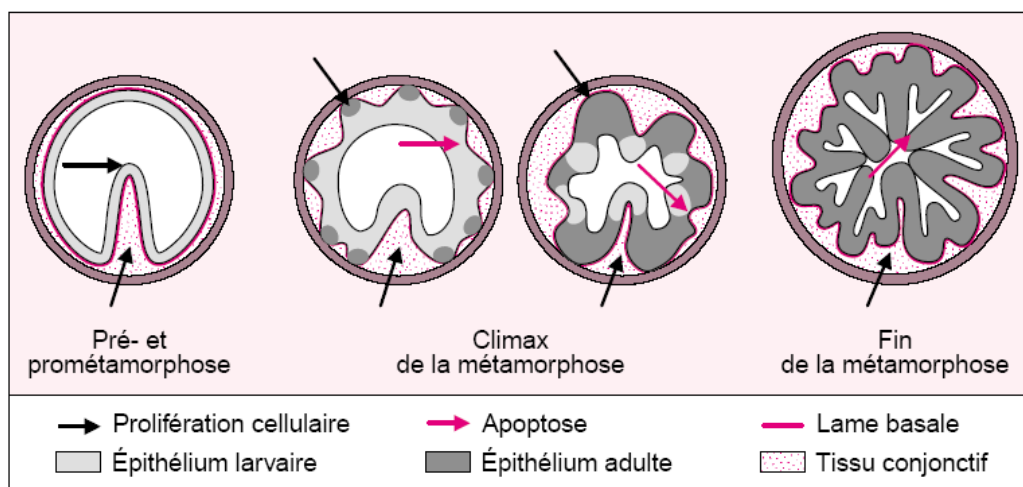
**Figure I.14 :** Régulation développementale de l'expression des gènes de TR $\alpha$  et TR $\beta$  durant la métamorphose. L'ARNm a été extrait dans les régions de la tête (en noir, « h »), du corps (en gris foncé ou en blanc, « m ») et de la queue (en gris pâle, « t ») de têtards à différents stades (St) avant (39, 44 et 52), durant (58 et 62) et après (66) la métamorphose. L'ARNm de TR $\alpha$  s'accumule dans tous les tissus à tous les stades, à des niveaux plus élevés que ceux d'ARNm de TR $\beta$  ; notons la présence d'une différence d'un facteur 10 au niveau des échelles pour leurs quantités relatives (Tata, 2006).



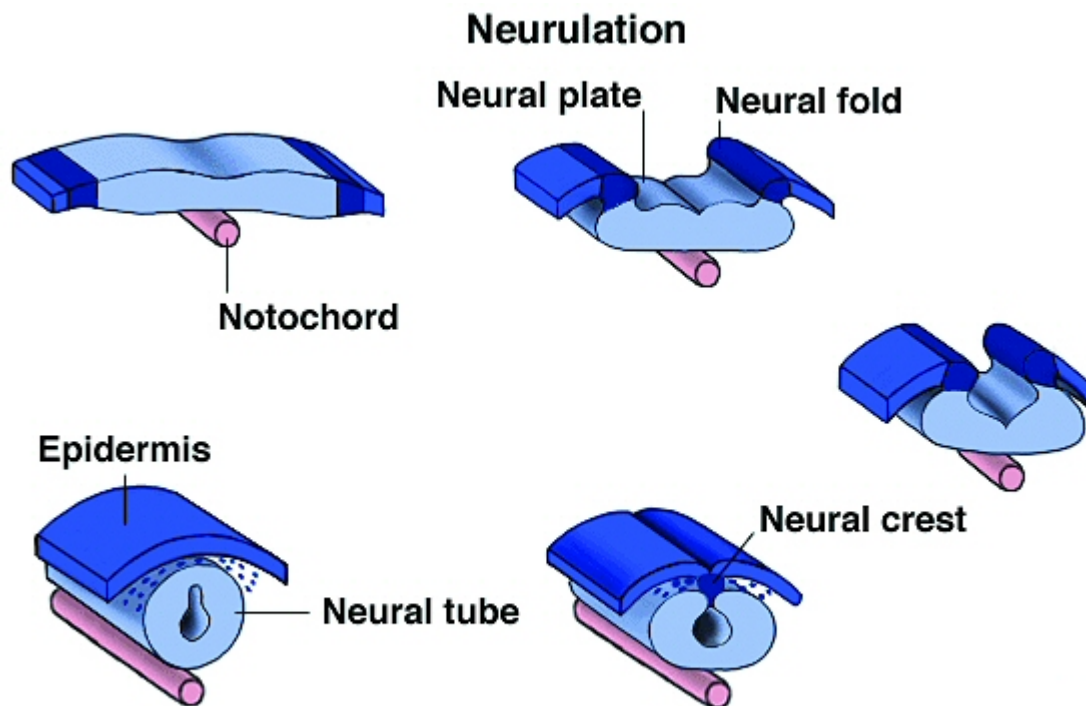
**Figure I.15 :** Schéma représentant la conversion de la T4 en T3 par la déiodinase de type 2 (D2). Cette figure montre également le rôle de la déiodinase de type 3 (D3) dans la conversion de la T4 en rT3 ainsi que de la T3 en T2 (Brown et Cai, 2007).



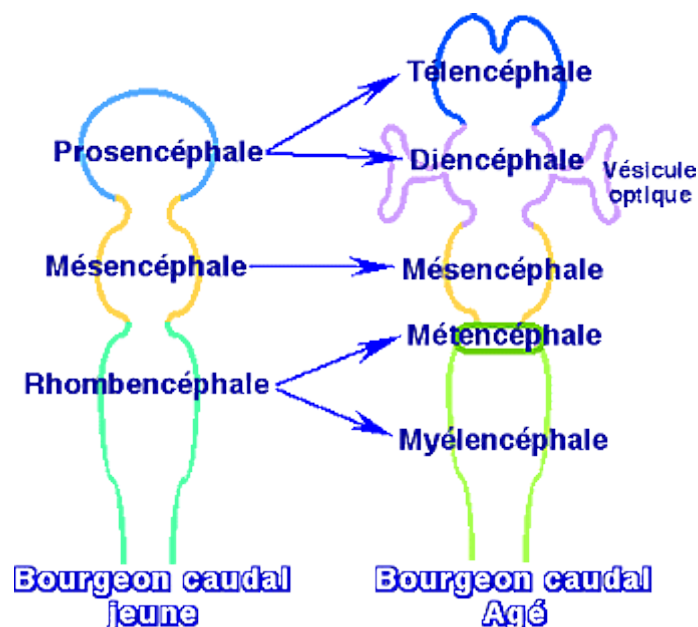
**Figure I.16 :** Mécanisme de régulation transcriptionnelle par les TRs. Le TR fonctionne comme un hétérodimère avec le RXR. L'hétérodimère se lie au TRE dans un gène cible. En absence de TH, l'hétérodimère réprime la transcription du gène, probablement via le recrutement d'un complexe corépresseur contenant le corépresseur N-CoR ou SMRT. Le corépresseur interagit avec Sin3A, qui à son tour recrute une histone déacétylase, comme Rpd3, pour déacétyler les histones, affectant ainsi la transcription. Lors de la liaison de l'hormone thyroïdienne, un changement conformationnel a lieu au niveau de l'hétérodimère, et serait responsable de l'expulsion du complexe corépresseur. Le TR lié recrute un complexe coactivateur contenant des coactivateurs comme SRC-1 ou CBP/p300 et P/CAF. Ces complexes possèdent une activité histone acétylase et pourraient fonctionner via une modification de la chromatine (Sachs *et al.*, 2000).



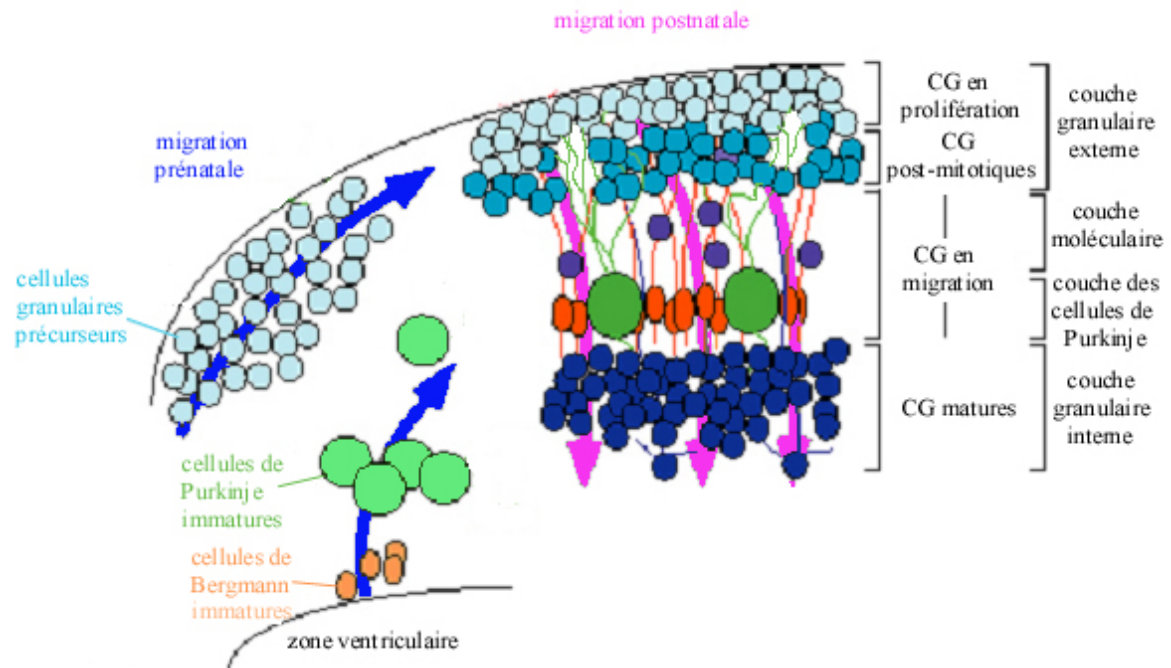
**Figure I.17 :** Métamorphose de l'intestin : au cours de la métamorphose de l'intestin, le tissu conjonctif prolifère tandis que l'épithélium larvaire entre en apoptose, laissant la place à l'épithélium adulte. Ces modifications sont associées à la formation de replis intestinaux et à des changements importants de l'état de la lame basale. Le climax est la période de la métamorphose durant laquelle les changements morphologiques sont les plus importants (Bertrand & Laudet, 2001).



**Figure I.18 :** Schémas représentant le processus de neurulation  
([http://www2.kenyon.edu/Depts/BioEllipse/courses/biol114/Chap14/Chapter\\_14.html](http://www2.kenyon.edu/Depts/BioEllipse/courses/biol114/Chap14/Chapter_14.html)).



**Figure I.19 :** Diagramme de la formation du cerveau à deux stades de l'organogenèse, depuis la région antérieure (prosencéphale, télencéphale) jusqu'à la région postérieure (rhombencéphale, myélocéphale) (<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/xenope1/index.htm>).



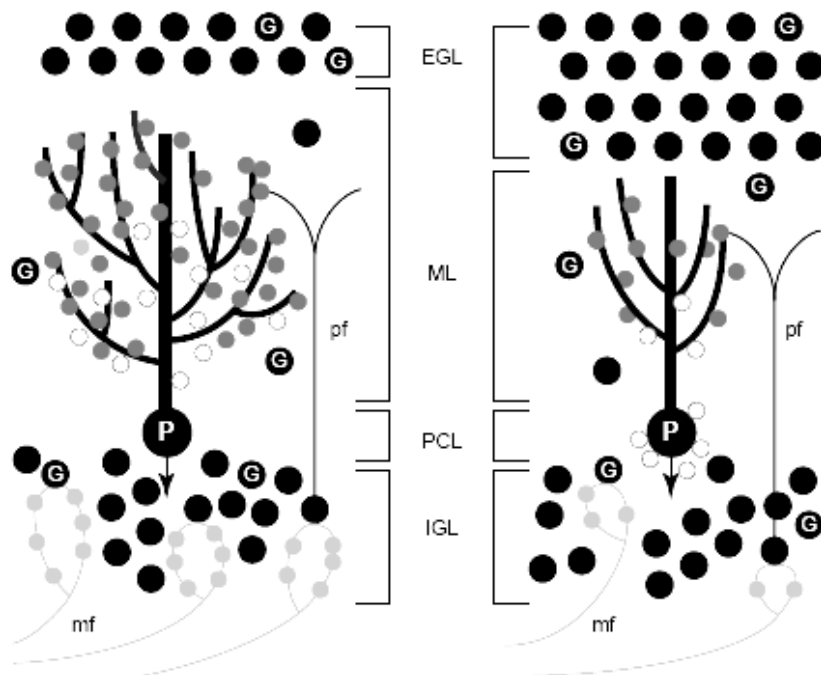
**Figure I.20 :** Structure du cortex du cervelet. Les flèches couleur fushia montrent la migration de cellules de la couche cellulaire granuleuse externe au-delà des cellules de Purkinje. Ces cellules se différencieront en neurones (Cayrou, 2003).

Insérer tableau I.3

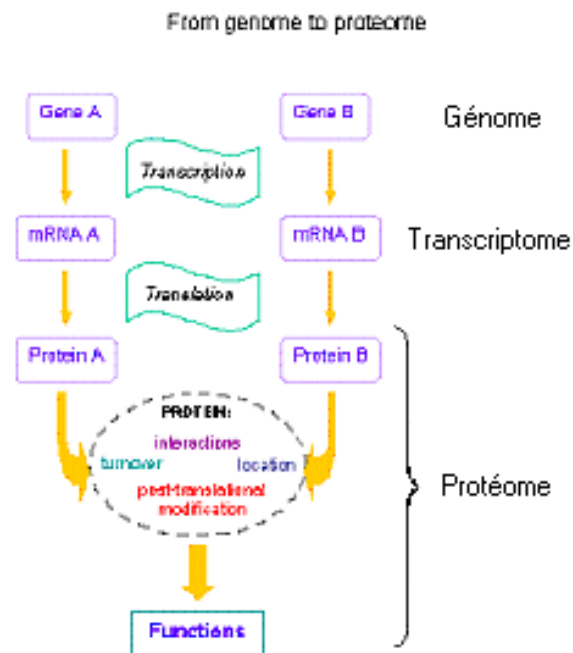




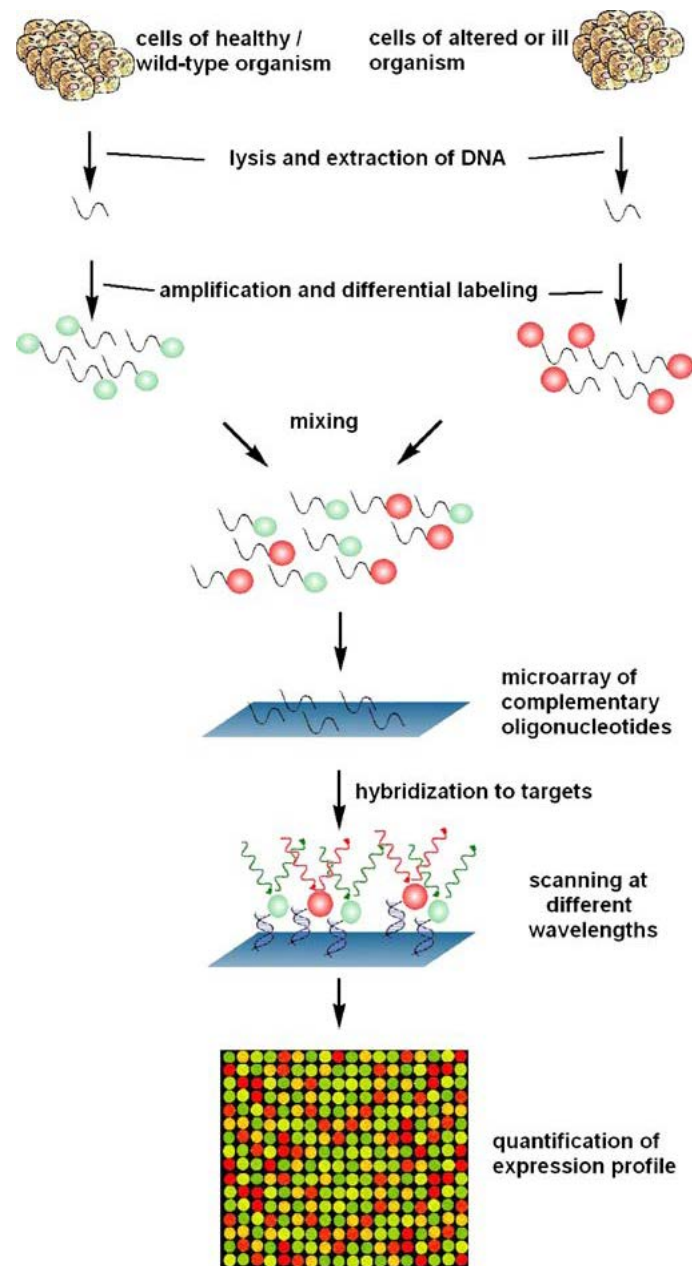
**Figure I.21 :** Photos montrant divers degrés de scolioses (flèche noire) chez des têtards de *Xenopus laevis* exposés à des concentrations de 300 et 400 ppb d'Aroclor 1254 (Jelaso *et al.*, 2003).



**Figure I.22 :** Diagramme schématisique représentant l'effet de l'hypothyroïdisme périnatal sur la neurogenèse et la différenciation dans le cortex du cervelet. Dans le cervelet hypothyroïdien, la disparition de la couche granuleuse externe (EGL) est retardée à cause d'un retard de prolifération et de migration des cellules granuleuses (points noirs) vers la couche granuleuse interne (IGL). Dans la couche moléculaire (ML), l'arborisation des dendrites des cellules de Purkinje (P) est diminuée. Les connexions synaptiques entre les dendrites des cellules de Purkinje et les fibres parallèles (pf) des cellules granuleuses (ronds gris pâle) diminuent aussi. Il y a un retard dans la disparition des synapses axosomatiques entre les fibres montantes et les cellules de Purkinje. (Koibuchi et Chin, 2000).



**Figure I.23 :** Progression du génome au transcriptome. Quand un gène est exprimé, l'ADN codant est transcrit en ARNm. Cet ARNm subit un épissage alternatif avec excision des introns. L'étude de l'expression des ARNm du génome s'appelle la transcriptomique. L'ARNm est ensuite traduit en protéines. Ces dernières peuvent subir des modifications post-traductionnelles souvent impliquées dans la structure tridimensionnelle de la protéine. L'analyse des profils d'expression des protéines s'appelle la protéomique (<http://www.medicine.manchester.ac.uk/cancerstudies/lrf/>).



**Figure I.24 :** Figure représentant le principe de base des puces à ADN (ou microarray). Les ADNc amplifiés par PCR de l'échantillon A (marqué avec une cyanine fluorescente rouge) et la référence B (marquée avec une cyanine fluorescente verte) sont incubés compétitivement sur un oligonucléotide microarray. La lecture se fait à 2 longueurs d'onde différentes en accord avec les cyanines utilisées. Une image pseudocolorée permettra alors de visualiser le taux d'échantillons hybridés sur chaque spot (Schäferling et Nagl, 2006).

# Deuxième partie

## Matériel et méthodes

## Matériel et méthodes

### 1. Choix du modèle biologique

Le modèle d'étude utilisé dans le cadre de nos recherches est le crapaud d'Afrique du Sud ou xénope *Xenopus laevis* également appelé crapaud à griffes (Figure II.1).

Les xénopes sont des amphibiens anoures qui appartiennent à la famille des *Pipidae*. Il existe différentes espèces et sous-espèces, toutes réparties sur le continent africain (Figure II.2).

Les amphibiens sont devenus des modèles biologiques couramment utilisés dans les recherches étudiant le développement et l'embryologie. Si le xénope est devenu une espèce courante dans les laboratoires, cela est dû à certaines caractéristiques intéressantes permettant un élevage simple et efficace. L'avantage majeur est son mode de vie. Le crapaud adulte a un cycle de vie essentiellement aquatique et ne remonte à la surface de l'eau que pour respirer (Tinsley et Kobel, 1996). Ces organismes tropicaux sont donc maintenus dans de simples aquariums ou dans des bassins contenant de l'eau déchlorée, dans une pièce thermostatisée à une température d'environ 23°C. Un autre avantage est sa prolificité et sa reproduction inductible à tout moment de l'année. En effet, une injection d'hormone gonadotrope chorionique humaine (hCG) dans les sacs lymphatiques dorsaux du mâle et de la femelle permet de stimuler la reproduction (Tinsley et Kobel, 1996). Le cycle de développement des oeufs ainsi que la métamorphose des têtards sont très rapides. Enfin, les pathologies sont peu nombreuses. Le xénope est plutôt résistant aux agents infectieux connus chez les amphibiens.

### 2. Elevage des xénopes

L'Unité de Recherche en Biologie des Organismes (URBO) des FUNDP dispose d'un petit élevage de xénopes depuis 2004 (Figure II.3). Les individus de départ proviennent du Centre d'élevage des Xénopes de l'Université de Rennes (France). Les mâles et les femelles sont élevés séparément dans des bacs contenant de l'eau déchlorée, dans une chambre thermostatisée, dont la température est maintenue à 25°C. La température de l'eau se situe donc aux alentours de 23°C. La photopériode est de 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Les xénopes sont nourris 3 fois par semaine avec des vers de vase congelés et leurs bassins sont nettoyés avant le nourrissage.

### 3. Induction de la reproduction et de la ponte

L'induction artificielle de la spermatogenèse chez le mâle et de l'ovulation chez la femelle est réalisée par injection d'une dose de 450 U.I.<sup>7</sup> d'hCG par animal. Cette dose est diluée dans 450 µl d'une solution physiologique (Ringer pour amphibiens ; Tableau II.1).

L'injection se fait dans les sacs lymphatiques dorsaux de l'animal (Figures II.4 et II.5). Ces sacs sont remplis de liquide lymphatique et sont en communication avec le système circulatoire lymphatique, favorisant ainsi la diffusion des hormones injectées<sup>8</sup>. Les animaux stimulés sont ensuite isolés des autres individus et déposés dans un bac fermé contenant de la solution FETAX-medium (Tableau II.2) où la reproduction et la ponte auront lieu. Cette opération se fait le soir vers 19 heures.

---

<sup>7</sup> Unités Internationales

<sup>8</sup> <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/XenAnimaLabo/index.html>

#### 4. Traitement des œufs

Douze heures après l'injection d'hCG, on observe la présence de grappes d'œufs dans le bac de ponte (Figures II.6 et II.7). Ces dernières sont récupérées à l'aide d'une pipette en plastique et déposées dans des berlines contenant un milieu de FETAX-medium. Les œufs sont ensuite placés durant 2 minutes dans une solution de L-cystéine (2g cystéine/100ml de FETAX-medium, pH 8,0) qui permet d'enlever la gangue mucilagineuse recouvrant les œufs. Ils sont ensuite rincés dans la solution FETAX-medium et un premier tri a lieu. Les œufs en division cellulaire (Figure II.8) sont conservés dans des berlines contenant du FETAX-medium dans la chambre thermostatée tandis que les autres sont éliminés. Le lendemain, un deuxième tri des œufs est réalisé. Seuls ceux qui sont allongés, c'est-à-dire ceux qui se trouvent en début de neurulation, sont gardés. Après éclosion ( $\approx$  48 heures après l'injection), les larves sont maintenues dans un aquarium contenant du FETAX-medium jusqu'au stade 48, c'est-à-dire jusqu'à J12 Post-Fécondation (PF).

#### 5. Schéma expérimental

Nous disposons de 15 berlines (5 conditions expérimentales, en triplicat) contenant chacun 18 têtards se trouvant dans 2 litres de solution FETAX-medium. Les têtards sont traités avec une mixture de PCBs, l'Aroclor 1254, à 3 concentrations environnementales : 0,1 ppb, 1 ppb et 10 ppb. Afin de dissoudre ces composés liposolubles que sont les PCBs, l'utilisation de diméthylsulfoxyde (DMSO) est requise ; dès lors, deux conditions contrôle sont nécessaires : le contrôle 0 (FETAX-medium) et le contrôle DMSO (solvant). Chaque condition expérimentale est présente en triplicat. Les concentrations en PCBs utilisées sont très faibles et couramment rencontrées dans l'environnement (Jelaso *et al.*, 2003, Zhou *et al.*, 2004).

Les berlines sont disposées dans un bain-marie, sous hotte aspirante dans la salle réservée aux manipulations de substances toxiques de l'URBO (Figure II.9). La température de l'eau de ce dispositif est maintenue aux alentours de 20°C à l'aide de deux résistances chauffantes thermostatées. Des bulleurs ont été disposés au-dessus de chacun des récipients afin de maintenir une bonne oxygénation du milieu. Les solutions sont changées toutes les 48 heures, les têtards morts sont enlevés et comptés. Les têtards, herbivores, reçoivent de l'aliment pour poisson en pastilles, composé de spirulines (Spirulina Tabs, Sera), ainsi que de l'aliment composé pour poisson présent sous la forme de flocons (Flora aliment composé vert, Sera).

Trois prélèvements sont réalisés au cours de l'expérience ; le premier à J32 PF, le second à J46 PF et le dernier quand 80 % des contrôles sont métamorphosés. Lors des deux premiers prélèvements, trois têtards de chaque récipient ont été anesthésiés et ensuite disséqués afin de prélever divers organes (queue, foie, mâchoire inférieure et cerveau) qui ont été fixés dans de l'azote liquide avant d'être congelés à -80°C. Un résumé illustré du plan expérimental et d'échantillonnage est repris à la figure II.10.

#### 6. Choix des stades de développement pour les prélèvements

Les différents échantillonnages ont été réalisés à des étapes importantes de la métamorphose définies par des stades particuliers facilement identifiables (Figure II.11). Le premier prélèvement a lieu avant l'entrée des têtards en prémétamorphose, 32 jours PF, ce qui correspond au stade (théorique) 54/55. Ce stade se caractérise par la pigmentation et l'apparition des os au niveau des bourgeons des pattes postérieures (Figure II.12) et correspond à la période durant laquelle la synthèse des hormones thyroïdiennes endogènes n'est pas encore effective. Le second prélèvement est réalisé pendant la prométamorphose, 46

jours PF. Il s'agit du stade 58, reconnaissable par la présence des bourgeons des pattes antérieures et la croissance des pattes postérieures. Durant cette période, il y a augmentation de la synthèse des THs endogènes. Enfin, le dernier prélèvement aurait dû être fait lorsque 80 % des têtards du groupe contrôle étaient complètement métamorphosés (disparition totale de la queue au stade 66). Cependant, en raison d'une mortalité importante des têtards dans les groupes 0,1, 1 et 10 ppb de PCBs, le dernier prélèvement eut lieu en plein climax métamorphique, aux alentours du stade 63. Pour les têtards de ce prélèvement, les stades précis auxquels ils se trouvaient lors de l'échantillonnage ont été notés.

## 7. Paramètres mesurés et observés durant l'expérience

Au moment de chaque nettoyage des berlines, les têtards morts sont comptés et ce, pour chaque condition expérimentale.

Lors des prélèvements, la masse et la taille du têtard sont mesurées ; les malformations situées au niveau de la queue sont observées et indiquées. Certains individus ont également été photographiés.

## 8. Dosage des PCBs dans l'eau, les aliments et les tissus des têtards de *Xenopus laevis*

Le dosage des PCBs est réalisé sur des échantillons d'eau, de nourriture et enfin sur les queues des têtards du 1<sup>er</sup> prélèvement, et sur les foies de ceux du 3<sup>ème</sup> prélèvement.

En raison d'une trop faible quantité de foies pour le prélèvement 1, le dosage des PCBs est réalisé sur les queues des têtards. Des comparaisons entre les concentrations en PCBs au début et à la fin de l'expérience ne seront donc pas possibles. Des échantillons de larves de *Chironomidae* (nourriture des géniteurs) ainsi que des aliments pour têtards ont été conservés pour analyse.

Ces dosages ont été réalisés au Laboratoire d'Ecologie Aquatique et d'Ecotoxicologie (LEEA, Ulg) du Professeur Jean-Pierre Thomé. Les protocoles sont renseignés en annexe.

## 9. Extraction et dosage des hormones thyroïdiennes T3 et T4

L'extraction et le dosage des hormones thyroïdiennes (Reyns *et al.*, 2002 ; Beck *et al.*, 2006) ont été réalisés sur les cerveaux, les foies et les mâchoires inférieures des têtards du premier et du second prélèvement. Les organes ont été poolés pour chacune des conditions et pour chaque prélèvement, afin d'obtenir une masse suffisante de tissu (300 à 500 mg) pour permettre la réalisation de l'extraction et ensuite du dosage.

La glande thyroïde est un organe diffus se situant dans la mâchoire inférieure des amphibiens, il est donc évident que cet organe sera utilisé dans cette étude. Concernant le foie, celui-ci est l'organe au sein duquel la transformation de la T4 en T3 a lieu, nous y retrouverons donc une quantité plus ou moins importante de ces 2 hormones. Enfin, en ce qui concerne le cerveau, celui-ci est également capable via les enzymes adéquates de transformer la T4 produite au niveau de la glande thyroïde en T3. De plus, cet organe est connu pour être particulièrement sensible aux fluctuations des niveaux en THs. Il est donc intéressant d'analyser les concentrations de ces hormones dans cet organe.



### ***9.1. Extraction des hormones thyroïdiennes T3 et T4 dans les matrices biologiques***

Dans le cadre de l'extraction des hormones thyroïdiennes, une masse de 300 à 500 mg de tissu est nécessaire. Les tissus sont pesés dans un eppendorf et maintenus gelés. On peut éventuellement mettre de la carboglace pour que les échantillons restent bien froids. L'homogénéisation des tissus se fait à l'aide d'un potter en verre d'un volume de 2 ml. Il faut ajouter au tissu 1,5 ml de méthanol. On homogénéise ensuite 2 fois 30 secondes et on verse l'homogénat dans un tube en verre de 10 ml. Le potter est rincé avec 500 µl de méthanol et on verse à nouveau dans le tube en verre contenant l'homogénat. Enfin, les tubes sont bouchés à l'aide des bouchons en plastique. Les homogénats seront placés à 4°C pendant une nuit.

Le lendemain, on ajoute 100 µl d'une solution contenant environ 2000 cpm de T3 et T4 marquées respectivement à l'iode 131 et 125, aux différents homogénats. On place également 100 µl de cette même solution dans 2 tubes en verre contenant 2 ml de méthanol (ils constitueront les blancs) et dans 4 tubes RIA qui serviront de total count (TC). On ajoute ensuite à tous les tubes, sauf aux TCs, 3 ml de chloroforme. Dans une seconde série de tubes présentant la même numérotation, on ajoute 1 ml de chloroforme. On ferme les tubes en verre avec les bouchons en plastique et on les vortexe un à un durant 15 secondes. Les tubes sont ensuite centrifugés pendant 15 minutes à 3000 rpm et à 4°C. Il faut ensuite transférer le surnageant à l'aide d'une pipette pasteur dans la seconde série de tubes contenant 1 ml de chloroforme. Aux tubes contenant les culots, on ajoute 2 ml d'une solution chloroforme/méthanol (1/2). On mélange à nouveau au vortex 15 secondes et on centrifuge 15 minutes à 3000 rpm et à 4°C. Les surnageants obtenus sont ajoutés à ceux précédemment isolés. Enfin, on ajoute aux tubes contenant les surnageants 0,05 % de CaCl<sub>2</sub> anhydre. Le volume à ajouter se calcule sur base de la quantité de tissus qui a servi pour faire les homogénats. On bouche les tubes et on mélange doucement en les retournant 4 fois. Les tubes sont placés une nuit à 4°C.

Des colonnes sont réalisées pour filtrer les échantillons. Il faut tout d'abord mettre un petit peu de fibre de verre utilisée pour l'HPLC (High Performance Liquid Chromatography) dans le fond de chaque colonne, avant de couler la résine. On place ensuite 1,8 ml de résine Bio-Rad AG 1-X2 préalablement conditionnée dans de l'acide acétique 70 % et rincée trois fois avec de l'eau milliQ. On prépare une colonne par échantillon et par blanc. Après avoir versé la résine dans les colonnes en verre, on attend que toute l'eau soit sortie des colonnes. Ensuite, on rince 5 fois chaque colonne avec 2 ml d'eau milliQ et 2 fois avec 2 ml de tampon pH 7 (Tableau II.3). Il faut veiller à ce que, entre les différents rinçages, tout le liquide se soit écoulé hors de la colonne.

En parallèle à la préparation des colonnes, on continue la préparation des échantillons. On sort les tubes qui ont passé la nuit au frigo et on marque le volume final au marqueur. La phase claire est prélevée à l'aide d'une pipette pasteur et est placée dans une nouvelle série de tubes, annotée de la même façon que précédemment. On ajoute ensuite dans les tubes contenant la phase plus dense un volume suffisant d'une solution chloroforme/méthanol/CaCl<sub>2</sub> (3/49/48) de telle sorte à arriver au trait précédemment tracé. On bouche les tubes et on les retourne délicatement 4 fois. On centrifuge ensuite durant 10 minutes à 2000 rpm et à 4°C. On prélève à nouveau la partie claire supérieure des tubes à l'aide d'une pipette pasteur en verre et on l'ajoute à la phase claire précédente.

La phase claire est ensuite reprise à l'aide d'une pipette pasteur et on fait passer l'échantillon sur la colonne correspondante. Les colonnes sont ensuite lavées consécutivement avec : 2 ml de pH 7 (Tableau II.3), 2 ml d'éthanol absolu, 2 ml de pH 7 (Tableau II.3), 2 ml de pH 4 (Tableau II.4), 2 ml de pH 3 (Tableau II.5), 2 ml d'acide acétique 1 % et enfin, 2 ml d'acide acétique 35 %. Les colonnes sont ensuite placées au-dessus de trois séries de tubes RIA

(radioimmunoassay) pour le compteur gamma. Dans la première série, on place les colonnes et on élue à l'aide de 500  $\mu$ l d'acide acétique 70 %. On déplace les colonnes au-dessus de la seconde série de tubes RIA et on élue à l'aide de 5 fois 500  $\mu$ l d'acide acétique 70 %. Enfin, on élue dans la troisième série de tubes RIA avec 500  $\mu$ l d'acide acétique 70 %.

Pour chaque échantillon et les blancs, on va compter les trois séries de tubes à l'aide d'un compteur gamma (1277 Gammamaster automatic gamma counter, LKB, Perkin-Helmer, Zaventem, Belgique) et ce, pour les deux isotopes présents. La majorité des hormones thyroïdiennes marquées ont été éluées dans la seconde série de tubes RIA. Cependant, une certaine quantité se retrouve quand-même dans les autres tubes. Un pool sera donc réalisé entre la seconde série de tubes RIA et un des deux autres tubes, celui contenant la plus grande fraction d'hormones marquées. Une seconde lecture, plus longue cette fois, sera de nouveau effectuée à l'aide du compteur gamma.

Le comptage effectué nous permet de calculer le taux de récupération des hormones marquées placées dans les homogénats en début d'extraction. Ceci nous permet d'évaluer la qualité de l'extraction. Dans le cas présent, le taux de récupération des THs se situe entre 59,4 et 80,0 % pour la T3 et entre 40,0 et 57,0 % pour la T4.

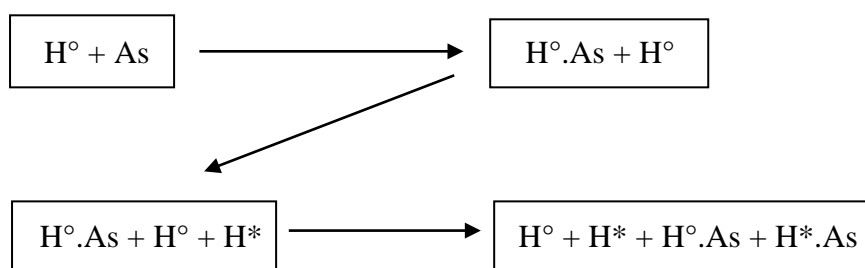
Enfin, les échantillons sont séchés pendant toute une nuit à l'aide d'un speed vac RC 1010 (Jouan, Saint-Herblain, France) et conservés à 4°C jusqu'au dosage RIA.

## ***9.2. Dosage des hormones thyroïdiennes T3 et T4 par la technique du Radioimmunoassay***

Le dosage des hormones thyroïdiennes dans les mâchoires inférieures, le foie et le cerveau s'effectue par RIA. Ce dosage a été réalisé au sein du laboratoire d'Endocrinologie Comparative (KUL) du professeur Veerle Darras.

### **9.2.1. Principe**

Le principe d'un dosage par RIA consiste à créer une compétition entre une hormone marquée ( $H^*$ ) par un isotope radioactif ( $H^3$  ou  $I^{125}$ ) et une hormone froide ( $H^\circ$ ) de concentration connue (standard) ou inconnue (échantillon) et ce, vis-à-vis d'un anticorps spécifique (As). Le schéma ci-dessous illustre le principe susmentionné.



Dans un premier temps, l'hormone froide est mise en contact avec l'anticorps qui lui est spécifique. Elle se retrouve ainsi sous forme libre ou complexée. On ajoute ensuite l'hormone marquée. Les quantités d'anticorps et d'hormone marquée restant constantes, toute augmentation de la concentration en hormone froide entraîne une réduction du taux de fixation de l'hormone marquée. Par la suite, on sépare l'hormone marquée liée à l'anticorps de l'hormone marquée libre. On peut dès lors mesurer la radioactivité de l'une de ces deux

fractions et par la suite, calculer la concentration en hormone froide présente dans l'échantillon. L'établissement d'une courbe standard permet de caractériser la décroissance du pourcentage d'hormone marquée qui se fixe à l'anticorps et ce, en présence d'une quantité progressivement croissante en hormone froide.

### 9.2.2. Méthode

Les échantillons sont tout d'abord suspendus dans 200 µl de tampon BSA-Barbital (Tableau II.6). Une solution standard de T3 (8 ng/ml) et de T4 (400 ng/ml) non marquée est également réalisée à l'aide de ce même tampon. Les anticorps anti-T3 et anti-T4 sont mis en solution dans le tampon BSA-Barbital à raison de dilutions 1/300 et 1/100, respectivement. Les hormones thyroïdiennes marquées à l'iode 125 sont, quant à elles, diluées dans du tampon BSA-Barbital-ANS (Tableau II.7) afin d'obtenir une concentration finale d'environ 10.000 cpm/50µl.

Dans un premier temps, 20 µl (pour le dosage de la T3) et 40 µl (pour le dosage de la T4) d'échantillon sont placés dans des tubes RIA en plastique préalablement numérotés (une série de tubes par hormones testées). En parallèle, une courbe standard comprenant 10 niveaux de dilution d'une solution stock en T3 ou T4 est réalisée en triplicat et ce, sur base des mêmes volumes utilisés pour les échantillons. Aux échantillons et standards sont ajoutés 40 µl d'anticorps anti-T3 et 50 µl d'hormones T3\* ou 100 µl d'anticorps anti-T4 et 50 µl d'hormones T4\*. Une série de trois blancs (tampon uniquement) et de trois Total Count (tampon + THs\*) est également réalisée. Les tubes sont alors vortexés et incubés pendant une nuit à température ambiante. Le lendemain, 50 µl de gamma globulines bovines en tampon Barbital (Tableau II.8) puis 500 µl de tampon PolyEthylèneGlycol (PEG) 20 % (Tableau II.8) sont ajoutés à l'ensemble des tubes (sauf blancs auxquels on ajoute du tampon BSA-Barbital) afin de précipiter les complexes hormone-anticorps. Les tubes sont alors incubés 15 minutes à température ambiante puis centrifugés, également à température ambiante, pendant 15 minutes à 3500 rpm. Une fois la centrifugation terminée, on aspire le tampon afin de ne laisser dans les tubes que les complexes précipités. Les tubes sont alors passés au compteur gamma afin d'évaluer la radioactivité émise par l'iode 125.

Concernant le dosage de la T3 par RIA, la limite de détection fut de 2 fmol/tube, la variabilité intra-test fut de 2,2 % et la variabilité inter-test fut de 9,6 %. Concernant le dosage de la T4 par RIA, la limite de détection fut de 5 fmol/tube, la variabilité intra-test fut de 2,8 % et la variabilité inter-test fut de 11,0 %.

## 10. Analyse protéomique

L'analyse protéomique a été réalisée sur le système nerveux central de têtards en prémétamorphose, au stade 54/55. Cette approche permet de mettre en évidence des variations de l'expression des protéines au sein de l'organe ciblé, selon le traitement expérimental et en comparaison avec un contrôle.

L'approche protéomique permet de séparer les protéines d'une cellule, d'un organe, d'un tissu ou d'un organisme entier selon deux dimensions : d'abord, en fonction de leur point isoélectrique (1<sup>ère</sup> dimension) et ensuite, selon le poids moléculaire de la protéine (2<sup>ème</sup> dimension). Dans le cadre de notre travail, des gels bidimensionnels à l'intérieur desquels les protéines ont été marquées en fluorescence (Two Dimension Difference In-Gel Electrophoresis ou DIGE) ont été réalisés (Figure II.13) (Graves et Haystead, 2002).

### **10.1. Extraction des protéines des échantillons**

Au vu des résultats obtenus pour le dosage des THs au prélèvement 1 et pour des raisons budgétaires, nous avons choisi de travailler avec 3 conditions expérimentales du premier prélèvement : le contrôle DMSO, 1 ppb et 10 ppb de PCBs.

Après dissection, les cerveaux des têtards (4 têtards par condition) ont été isolés et homogénéisés à l'aide d'un sonicateur virsonic (Virtis, N-Y, USA) dans du tampon de lyse DLA (Tableau II.9) selon un rapport masse/volume 1:3 (dilution 1:3) avant d'être centrifugés 15 minutes, à 13000 rpm, à température ambiante. Le surnageant est récupéré, aliquoté et congelé à -80°C avant la réalisation d'un dosage de protéines par la méthode Bradford.

### **10.2. Dosage des protéines par la méthode Bradford**

Le dosage a été effectué selon la méthode décrite par Bradford. Une droite d'étalonnage est réalisée à l'aide de différentes concentrations en albumine sérique bovine (BSA) afin de pouvoir déterminer la concentration en protéines dans nos échantillons. Vingt mg de BSA sont ajoutés à 10 ml d'eau bidistillée. Le blanc spectrophotométrique contient 5 µl d'eau bidistillée et des concentrations croissantes en BSA (2,5 µl et 5 µl) sont utilisées pour la réalisation de la droite d'étalonnage, le tout se trouvant dans 1ml de solution Biorad diluée 5 fois. Le blanc spectrophotométrique pour le dosage de protéines des échantillons est constitué d'1 µl de solution de lyse DLA. Les échantillons sont analysés en triplicat, le tout dans 1 ml de solution Biorad diluée 5 fois. L'absorbance est ensuite lue au spectrophotomètre Ultraspec 2100 *pro* (Amersham Biosciences, Uppsala, Suède) à 595 nm.

### **10.3. Préparation des échantillons**

Dans les analyses utilisant la technique du 2D-DIGE, les protéines sont marquées avec des fluorochromes. Pour ce faire, les échantillons sont mis en présence de cyanines avant la réalisation de l'électrophorèse en Isoelectric Focusing (IEF) (1<sup>ère</sup> dimension). Un même gel renferme 3 conditions qui sont marquées différemment : le standard interne et 2 conditions expérimentales.

Pour de tels gels, une vérification du pH des échantillons sur papier indicateur est primordiale. Celui-ci doit se situer entre 8,5 et 9 et sera remonté à l'aide d'1 µl d'une solution de NaOH 50 mM si nécessaire. Après mise à pH, un dosage des protéines par la méthode Bradford est de nouveau réalisé.

Les mélanges des différentes conditions présentes au sein d'un même gel sont préparés tel que décrit dans le Tableau II.10.

Une quantité de 75 µg de protéines est chargée par gel dont 25 µg sont colorés à la cyanine 2, 25 µg à la cyanine 3 et 25 µg à la cyanine 5. Le standard interne renferme toutes les protéines de toutes les conditions expérimentales étudiées dans la manipulation, ce qui permettra par après une normalisation et une comparaison de tous les gels réalisés entre eux.

Pour la coloration de 25 µl de protéines, 1 µl de cyanine est nécessaire. Sept microlitres de Cy 2 sont ajoutés au standard interne, 1 µl de Cy 3 à 6 échantillons et 1 µl de Cy 5 aux 6 autres. Les échantillons sont ensuite conservés dans de la glace et à l'obscurité durant 30 minutes. Les cyanines vont se fixer sur les résidus lysine des protéines présentes dans les échantillons. Ensuite, 7 µl de lysine sont ajoutés au standard interne et 1 µl est ajouté à chaque condition. Les eppendorfs sont mélangés et de nouveau déposés dans de la glace, dans le noir pendant 10 minutes. Enfin, du tampon de réduction (Tableau II.11) est ajouté dans les eppendorfs qui sont ensuite vortexés et conservés 15 minutes à température ambiante. Les échantillons sont

centrifugés 10 minutes à 13000 rpm. Les solutions sont mélangées dans 6 eppendorfs (1 eppendorf par gel) et centrifugées avant d'être chargées sur les gels.

#### **10.4. Electrophorèse en IEF**

Une réhydratation passive de 6 strips de 24 cm au gradient de pH 4-7 est réalisée durant 19 heures. Du tampon de réhydratation (Tableau II.12) est déposé dans les différentes rainures du Reswelling Tray (Amersham Biosciences) : 450 µl par gel. Chaque gel est ensuite recouvert par 3 ml d'huile (Drystrip Cover Fluid solution).

Une électrophorèse est lancée le lendemain. Les échantillons sont préalablement réduits dans un tampon de réduction contenant du dithiothreitol (DTT) et des IPG 4-7 (Tableau II.11). Dans le cas d'une coloration à l'argent, une quantité de tampon de réduction identique au volume de l'échantillon est ajoutée et le tout est laissé 20 minutes à température ambiante. Le mélange sera ensuite centrifugé à 13000 rpm durant 10 minutes, toujours à température ambiante. Pour le 2D-DIGE, le même volume de tampon de réduction que celui présent dans l'eppendorf (échantillon + cyanine + lysine) est ajouté.

Le gel réhydraté est placé dans une rangée du Manifold (Amersham Biosciences) lui-même déposé sur l'IPGphor (Amersham Biosciences). Pour les gels colorés à l'argent, 100 µg de protéines sont chargées par gel, 75 µg pour le 2D-DIGE. La 1<sup>ère</sup> dimension dure 19 heures. Le programme suivi par l'IPGphor est celui présent dans le tableau II.13.

Les gels seront ensuite conservés à -80°C jusqu'à la réalisation de l'électrophorèse SDS-PAGE (2<sup>ème</sup> dimension).

#### **10.5. Electrophorèse SDS-PAGE**

Une solution d'acrylamide 12,5 % est préparée (Tableau II.14). Quinze minutes après avoir préparé cette solution, la température est ajustée à 21°C. Une fois la bonne température atteinte, le tétraméthyléthylènediamine (TEMED) puis le persulfate d'ammonium (APS) sont ajoutés. L'APS initie la polymérisation ; c'est à ce moment que la solution est coulée dans un Caster (Amersham Biosciences) jusqu'à environ 1 cm du bord des plaques de verre. Du butanol saturé en eau est déposé au-dessus de chaque plaque afin d'éviter que le contact air-gel n'empêche la polymérisation. Les gels sont sortis du Caster le lendemain et conservés en chambre froide à 4°C jusqu'à utilisation.

Les strips (gels de 1<sup>ère</sup> dimension) sont sortis du congélateur et placés dans une solution d'équilibration (Tableau II.15). Les gels sont tout d'abord déposés dans du tampon d'équilibration contenant du DTT 1 % (Tableau II.15a) durant 15 minutes. Ils sont ensuite placés pendant 15 minutes dans du tampon d'équilibration auquel a été ajouté de l'iodoacétamide 2,5 % (Tableau II.15b). Les strips sont scellés entre les plaques de verre, au-dessus du gel d'acrylamide, à l'aide d'une solution d'agarose (Tableau II.16). Le montage est alors placé dans une cuve d'électrophorèse (Electrophoresis Unit, Amersham Biosciences) remplie de tampon d'électrophorèse (Tableau II.17). La migration a lieu durant 19 heures.

#### **10.6. Révélation**

##### **10.6.1. Coloration à l'argent**

Plusieurs gels colorés à l'argent ont été réalisés lors des différents essais de protéomique. La 2<sup>ème</sup> dimension terminée, les gels sont démoulés dans de l'eau bidistillée et placés délicatement dans un bain de fixation (Tableau II.18) durant 30 minutes. Les gels sont ensuite

incubés durant une nuit en chambre froide à 4°C dans une solution contenant de la glutaraldéhyde (Tableau II.19). Ils sont rincés 3 fois 10 minutes dans de l'eau bidistillée avant d'être laissés dans un bain à l'argent (Tableau II.20) durant 30 minutes, à l'abri de la lumière. Deux rinçages de 1 minute suivent, avant de placer les gels dans une solution Developing (Tableau II.21) durant quelques minutes, jusqu'au moment où les spots sont bien visibles. La révélation est arrêtée à l'aide d'une solution Stop (Tableau II.22). Enfin, les gels sont conservés dans de l'eau bidistillée et scannés à l'aide du logiciel ImageMaster™2D (Amersham Biosciences).

### **10.6.2. Le 2D-DIGE**

Une fois la migration terminée, les plaques de verre sont sorties de la cuve d'électrophorèse. Elles sont rincées à l'eau bidistillée, essuyées puis placées dans le scanner Typhoon 9400 (Amersham Biosciences). Les gels sont scannés à 3 longueurs d'onde différentes, chacune correspondant à la longueur d'onde d'absorption de chacune des cyanines présentes dans le gel (Cy 2, Cy 3 et Cy 5). Une image par longueur d'onde est enregistrée et divers paramètres sont fixés et conservés pour standardiser le scan de tous les autres gels.

Les 6 gels scannés aux 3 longueurs d'onde sont envoyés vers le programme DeCyder™ 2D 6.5 (Amersham Biosciences). Cet outil informatique va d'abord détecter tous les spots présents sur chacun des 6 gels, les dénombrer et définir un gel appelé « Master Gel » qui est celui contenant le maximum de spots. Ce dernier servira de référence pour la normalisation des 5 autres.

Les gels sont ensuite comparés un à un au Master gel. Une correspondance des spots de tous les gels est effectuée par le programme. Cependant, une vérification manuelle est nécessaire. Enfin, une comparaison des spots entre les différentes conditions a lieu. Le programme retient les spots qui présentent une variation d'expression (sur- ou sous-expression) significative ( $p < 0,05$ ) et les répertorie dans une liste.

### **10.6.3. Coloration au krypton**

Trois autres gels sont marqués au krypton, et sont chargés 6 fois plus en protéines (450 µg de protéines par gel). Ce type de gel sert de support à l'identification des spots en spectrométrie de masse.

Après avoir été démoulés, les gels sont placés dans une solution de fixation (Tableau II.23) durant 30 minutes. Cette étape est répétée une seconde fois. Les gels sont ensuite rincés 5 minutes dans de l'eau bidistillée. Après quoi, ils sont déposés dans un bain de krypton dilué 10 fois, sous hotte, à l'obscurité et à température ambiante, pendant toute une nuit. Le lendemain, un bain d'acide acétique 5 % est réalisé et les gels y sont plongés durant 5 minutes. Enfin, 2 rinçages de 15 minutes à l'eau bidistillée sont nécessaires avant de pouvoir scanner les gels au moyen du scanner Typhoon 9400. L'extraction des protéines d'intérêt se fait à l'aide de l'Ettan™ spot picker (Amersham Biosciences).

## 11. La spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique de détection et d'identification extrêmement sensible qui permet de déterminer la composition d'un échantillon et d'identifier rapidement une protéine isolée par un gel 2D.

Après excision des spots des gels 2D, les échantillons sont placés à 4°C jusqu'à utilisation. Tout d'abord, une digestion trypsique des échantillons est effectuée. La trypsine est une enzyme qui va cliver les protéines au niveau de deux acides aminés basiques : la lysine et l'arginine. Ceux-ci vont s'ioniser et acquérir une charge positive. Les peptides résultants sont envoyés pour analyse en spectrométrie de masse (MS). Dans notre étude, un spectromètre de masse de type nanoLC MS/MS a été utilisé. Le nanoLC MS/MS est constitué de deux éléments essentiels : tout d'abord, d'un couplage entre une microcolonne de chromatographie liquide (LC) C18 (CapLC, Waters) et un nanoélectrospray. Ensuite, deux spectromètres de masse (spectromètres de masse en tandem ou MS/MS) (Q-tof II, Waters) séparés par une cellule de collision (Figure II.14) (Dongré *et al.*, 1998).

### 11.1. *Couplage chromatographie liquide – spectrométrie de masse en tandem*

L'échantillon est injecté à l'intérieur de la microcolonne de chromatographie liquide avant d'être envoyé vers un premier spectromètre de masse. La colonne de chromatographie est reliée à un fil de platine qui constitue une électrode et sert à fournir un certain voltage à l'électrospray pour permettre l'ionisation de l'échantillon (Young Bang *et al.*, 2006). L'ionisation électrospray va augmenter le nombre de charges positives portées par les peptides. Les ions formés sont attirés par un champ électrique et pénètrent dans le premier spectromètre (Promé, 1997). Ensuite, il y a sélection d'un peptide deux fois ou trois fois chargé. Ce dernier est envoyé dans une cellule de collision où il sera soumis à une très forte énergie qui cassera le peptide. Ses produits de fragmentation seront ensuite analysés par un second spectromètre de masse qui mesurera le rapport de la masse sur la charge des fragments obtenus et produira un spectre MS/MS. Ce dernier est composé de la masse du peptide, et d'un signal continu qui est traité et transformé en une série de pics.

Pour identifier les protéines de l'échantillon, il faut alors parvenir à associer chaque pic du spectre MS/MS avec une séquence peptidique connue (Gras, 2004). Pour ce faire, les différentes séquences peptidiques obtenues sont blastées dans différentes bases de données : NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), UNIPROT (<http://www.expasy.uniprot.org>), MS-BLAST (<http://dove.embl-heidelberg.de/blast2/msblast.html>).

### 11.2. *Score de MOWSE*

Le traitement statistique utilisé en spectrométrie de masse est le score de MOWSE (MOlecular Weight SEarch). Ce score calcule l'erreur entre la masse théorique des peptides et les masses expérimentales mesurées par le nanoLC MS/MS (ou Q-tof). Dans les analyses de type Q-tof, ce score est significatif quand sa valeur est supérieure à 26. Plus le score de MOWSE est élevé, plus le pourcentage de recouvrement entre la séquence obtenue et la séquence théorique est élevé.

## 12. Traitement statistique des données

Une analyse statistique est effectuée pour le traitement des données de poids des têtards. Tout d'abord, les données brutes obtenues sont encodées dans le logiciel Excel (Microsoft). Ensuite, l'analyse statistique est réalisée à l'aide du logiciel STATISTICA 5.5 (Statsoft).

Un test paramétrique est effectué par la méthode de l'analyse de la variance à 1 critère de classification (ANOVA 1) pour les données concernant chacun des prélèvements, pris isolément. Le critère de classification considéré ici est le traitement. Un seuil de probabilité significatif de 5 % est retenu. L'homogénéité des variances est vérifiée à l'aide du test de Hartley-Bartlett. Puis, afin de déterminer quel traitement diffère des autres, le test de Scheffé est réalisé.

Ensuite, une analyse de la variance à 2 critères de classification à mesures répétées (ANOVA 2) est réalisée. Le temps et la concentration en PCBs sont définis comme étant 2 critères de classification. De nouveau, un seuil de probabilité significatif de 5 % est retenu et l'homogénéité des variances est vérifiée à l'aide du test de Hartley-Bartlett. Enfin, le test de Scheffé est effectué sur base du critère temps et/ou de la concentration en PCBs.



### **Liste et références des produits utilisés.**

- Hormone Chorionique humaine hCG (Sigma-aldrich, Steinheim, Germany)
- L-cystéine, non-animal source (Sigma-aldrich)
- Spirulina Tabs (Sera, Heinsberg, Allemagne)
- Flora aliment composé vert (Sera)
- Aroclor 1254 (ALLTECH Associates Inc, Lokeren, Belgium)
- Diméthylsulfoxyde DMSO (Sigma-aldrich)
- T3\*<sup>131</sup>, T3\*125, T4\*<sup>125</sup> (Perkin-Elmer, Zaventem, Belgique)
- Chloroforme pro-analyse (Merck, Hohenbrunn, Allemagne)
- Méthanol pro-analyse (Merck)
- Résine DOWEX AG 1-X2 (Biorad, Nazareth Eke, Belgique)
- Ethanol absolu pro-analyse (Merck)
- Sodium barbital (Merck)
- Sodium azide (Merck)
- Ethylène-Diamine-TétraAcétique EDTA titriplex (Merck)
- T3, T4 solution standard (Byk-Sangtec, Bruxelles, Belgique)
- Anticorps de lapin anti-T3 de rat et anti-T4 de rat (Byk-Sangtec)
- Analine Naphtalène Sulphonique ANS (Fluka, Steinheim, Allemagne)
- Gamma globuline bovine (Sigma-aldrich)
- PolyEthylèneGlycol PEG (Sigma-aldrich)
- Albumine de Sérum Bovin BSA (Sigma-aldrich)
- Biorad protein assay (Biorad, Munich, Allemagne)
- DiThioTreitol DTT Plus-One (Amersham Bioscience)
- IPG strips 24 cm, pH 4-7 (Amersham Bioscience)
- 30% Acrylamide/Bis solution, 37.5 :1 (2.6%C) (Biorad)
- TetraméthyléthylèneDiamine TEMED Plus-One (Amersham Bioscience)
- Amoniumpersulfate APS Plus-One (Amersham Bioscience)
- Iodoacétamide Plus-One (Amersham Bioscience)
- Agarose Plus-One (Amersham Bioscience)
- Glutaraldéhyde (Merck)
- Krypton<sup>TM</sup>Protein Stain (PIERCE, Rockford, IL, USA)
- Drystrip Cover Fluid solution (Amersham Bioscience)
- Urée Plus-One (Amersham Bioscience)
- Thiourée Plus-One (Amersham Bioscience)
- CHAPS Plus-One (Amersham Bioscience)
- Immobililine pH gradient IPG 4-7 Plus-One (Amersham Bioscience)
- Bleu de bromophénol (Amersham Bioscience)
- Tris Plus-One (Amersham Bioscience)
- Sodium Dodecyl Sulfate SDS Plus-One (Amersham Bioscience)
- Glycérol 87% pro analyse (merck)
- Glycine Plus-One (Amersham Bioscience)
- Acide acétique pro-analyse (Merck)
- Nitrate d'argent Analytic reagent (Sigma)
- Formaldéhyde 35% (Merck)

Troisième partie

Résultats

# Résultats

Pour rappel, l'objectif principal de ce travail est d'étudier les effets des polychlorobiphényles sur le système nerveux du xénope *Xenopus laevis*, et ce au niveau protéomique essentiellement. Cependant, diverses analyses concernant le taux de survie, le poids, la morphologie des têtards et les concentrations en hormones thyroïdiennes dans divers organes ont été réalisées. En effet, une étude de ce type n'ayant encore jamais été mise en place auparavant de par les doses utilisées ainsi que par sa durée, il est tout d'abord utile de faire des observations morphologiques et comportementales. Ensuite, il a été établi que les hormones thyroïdiennes interviennent dans le développement du système nerveux central et sont des cibles potentielles des PCBs, il est donc également intéressant d'étudier l'évolution de leurs concentrations, notamment au sein du système nerveux central.

## 1. Taux de survie, poids et morphologie des têtards de *Xenopus laevis*

### 1.1. Rappel du protocole expérimental

Des têtards de xénopes ont été contaminés durant 42 jours (de J12 PF à J54 PF) avec 3 doses environnementales d'une mixture de PCBs, l'Aroclor 1254 solubilisé dans du DMSO. L'expérience n'a été réalisée qu'une seule fois. Les PCBs ont été ajoutés dans une solution d'élevage (FETAX-medium) à des concentrations de 0,1, 1 et 10 ppb. Nous disposons également de 2 groupes contrôles : le contrôle 0 recevant uniquement la solution FETAX, et le contrôle DMSO c'est-à-dire le contrôle solvant, recevant du FETAX ainsi que 10 ppb de DMSO.

Chaque condition expérimentale est réalisée en triplicat et chaque triplicat comportait un nombre initial de 18 têtards.

Nous avons réalisé 3 prélèvements, le premier durant la prémétamorphose, le second en prométamorphose et le dernier en plein climax métamorphique.

### 1.2. Taux de survie

Le nombre d'individus survivants a été enregistré tout au long de l'expérience. La survie des têtards se trouvant dans les différents berlines a été très élevée durant les 50 premiers jours de la manipulation. Cependant, à partir du jour J53 PF, une mortalité plus importante a été observée dans toutes les conditions expérimentales, y compris chez les groupes contrôles. En effet, les taux de survie pour les conditions contrôle 0, DMSO, 0,1, 1 et 10 ppb de PCBs ont respectivement été réduits à 58,3 %, 44,4 %, 38,9 %, 44,4 % et 22,2 %.

La mort des têtards observée à partir du J53 PF se produisait précisément une fois ces derniers arrivés au stade 63 de la métamorphose. Cette mortalité soudaine est probablement due au passage du régime alimentaire herbivore à celui de carnivore. L'apport d'une alimentation à base de vers de vase a probablement été trop tardif et les têtards, dont l'intestin s'est raccourci, n'ont plus été en mesure de s'alimenter.

Un taux de survie cumulé est calculé pour les différents traitements, à échéance des différentes dates de prélèvement. Ces valeurs sont présentées dans le tableau III.1.

**Tableau III.1 :** Taux de survie cumulé pour chacun des traitements à échéance des différentes dates de prélèvement (P1, P2 et P3). Les valeurs sont exprimées en pourcentage.

	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>
<b>CTL 0</b>	98,1	97,8	58,3
<b>DMSO</b>	94,4	91,1	44,4
<b>0,1 ppb</b>	96,3	86,7	38,9
<b>1 ppb</b>	100,0	86,7	44,4
<b>10 ppb</b>	96,3	95,6	22,2

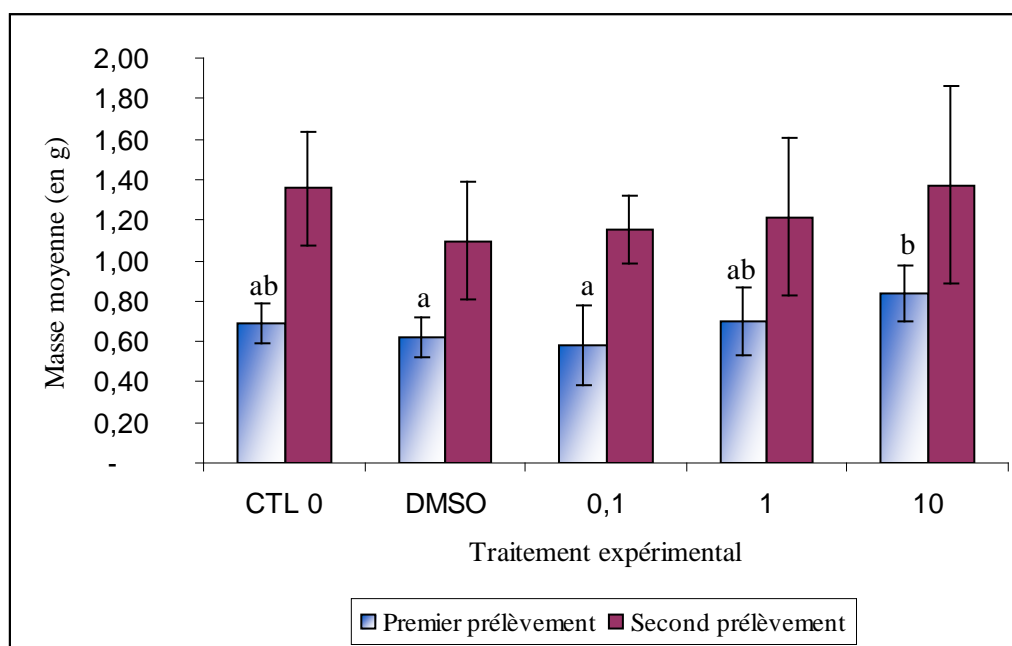
### 1.3. Poids des larves

Deux types d'analyses statistiques des données ont été utilisés. Tout d'abord, une ANOVA 1 à mesures répétées est réalisée pour chacun des prélèvements (P1 et P2), considérés isolément. L'ANOVA 1 permet de détecter un effet éventuel du traitement sur le poids des têtards. Ensuite, une ANOVA 2 à mesures répétées est réalisée. Celle-ci permet de définir s'il existe un effet du traitement, du temps et/ou d'une interaction entre le traitement et le temps sur le poids des individus.

La figure III.1 représente l'évolution de la masse moyenne des têtards lors du premier et du second prélèvement en fonction des différents traitements. Pour des raisons scientifiques et d'interprétation, nous n'avons pas pris en compte le troisième prélèvement. Nous observons au premier prélèvement une augmentation de la masse des têtards corrélée avec l'augmentation de la dose de PCBs reçue. En effet, le poids moyen passe de  $0,58 \pm 0,20$  g pour la condition 0,1 ppb, à  $0,70 \pm 0,17$  g et  $0,84 \pm 0,14$  g respectivement pour les groupes 1 et 10 ppb de PCBs. Par contre, nous observons une masse plus faible, non significative, des têtards de la condition 0,1 ppb par rapport aux contrôles 0 et DMSO dont les masses moyennes sont respectivement de  $0,69 \pm 0,10$  g et de  $0,62 \pm 0,10$  g. L'analyse statistique (ANOVA 1,  $p < 0,05$ ) ainsi que le test de Scheffé ont permis de mettre en évidence une différence significative entre le contrôle DMSO et la condition 10 ppb de PCBs ainsi qu'entre la condition 0,1 ppb et la condition 10 ppb de PCBs.

Pour le second prélèvement, l'observation de l'augmentation du poids moyen corrélée avec l'augmentation de la dose de PCBs reçue est moins nette. En effet, le poids passe de  $1,16 \pm 0,17$  g pour le traitement 0,1 ppb de PCBs à  $1,22 \pm 0,39$  g et  $1,37 \pm 0,48$  g pour les conditions 1 ppb et 10 ppb, respectivement. Cette fois, nous n'avons pas mis en évidence de différence significative entre les différentes conditions (ANOVA 1,  $p < 0,05$ ). Le test de Scheffé a permis de confirmer qu'aucune différence significative n'existait entre les différents traitements. Les PCBs n'ont pas d'effet sur le poids des têtards de xénope à ce stade.

Enfin, le suivi du poids des têtards en fonction des différents prélèvements et du temps nous montre qu'il y a à la fois un effet du temps et du traitement. Cependant, il n'existe pas d'interaction entre le traitement et le temps (ANOVA 2,  $p < 0,05$ ). Le test de Scheffé nous confirme ce résultat. L'effet du temps sur l'augmentation du poids des têtards est logique puisque les têtards sont soumis au phénomène de croissance durant cette période post-embryonnaire. L'effet du traitement n'est quant à lui visible que pour le premier prélèvement.



**Figure III.1 :** Evolution de la masse moyenne des têtards de xénopes lors du premier et du second prélèvement pour chacune des 5 conditions expérimentales. Les traitements qui partagent au moins une lettre (a, b) ne sont pas significativement différents.

#### 1.4. Morphologie des têtards

Des malformations ont été observées au niveau de la queue des têtards (Figure III.2). Elles sont présentes chez la majorité de ceux qui ont été prélevés pour les conditions 1 ppb et 10 ppb de PCBs. Le nombre d'individus malformés est moins élevé pour la condition 0,1 ppb ainsi que chez les contrôles 0 et DMSO. Certains têtards du contrôle 0 sont également malformés mais ceux-ci sont en minorité. Le contrôle DMSO est quant à lui plus touché que le contrôle 0. D'un point de vue quantitatif, nous observons que les individus prélevés pour les contrôles 0 et DMSO présentent des taux de malformations à raison respectivement de 20 % et de 44 %. Pour les conditions 0,1, 1 et 10 ppb, ces valeurs s'élèvent à 58 %, 79 % et 81 %.

Lors du second prélèvement, nous avons également décelé la présence de deux têtards possédant 5 pattes, l'un ayant 3 pattes antérieures et l'autre 3 postérieures.

## 2. Validation des contaminations des organismes

Pour rappel, le dosage des PCBs a été réalisé sur des échantillons d'eau (prélevés en fin de manipulation), de nourriture et enfin sur un pool de queue de têtards du 1<sup>er</sup> prélèvement, et du foie de ceux du 3<sup>ème</sup> prélèvement, le foie des têtards lors du premier prélèvement étant trop petit pour permettre un dosage de PCBs.

Des échantillons de larves de *Chironomidae* (nourriture des géniteurs) ainsi que des flocons et des spirulines (aliments des têtards) ont été conservés pour analyse.

Le tableau III.2 présente les concentrations en équivalent d'Aroclor 1254 ( $\mu\text{g/g}$ ) par rapport au poids frais et par rapport au poids de lipides des têtards.

**Tableau III.2 :** Concentrations en PCBs (équivalent en Aroclor 1254) mesurées dans les tissus des têtards de xénopes. Les valeurs sont exprimées en µg/g de poids frais et en µg/g de lipides.

Echantillon		µg/g de poids frais	µg/g de lipides
CTL 0	Queue	44,90	11463,00
	Foie	113,19	4080,40
DMSO	Queue	16,64	4613,68
	Foie	125,43	7350,54
0,1 ppb	Queue	75,51	21441,90
	Foie	223,41	18385,46
1 ppb	Queue	198,01	59219,31
	Foie	439,87	42633,57
10 ppb	Queue	1347,86	396431,91
	Foie	3107,76	142421,87

De façon générale, la concentration en PCBs (par rapport au poids frais) est plus élevée dans le foie que dans la queue des têtards. Les contrôles 0 et DMSO présentent de faibles niveaux en PCBs dans leurs tissus. En effet, les queues des têtards du contrôle 0 et du DMSO contiennent respectivement 44,90 et 16,64 µg de PCBs/g de poids frais et 11463,00 et 4613,68 µg de PCBs/g de lipides. Il en va de même pour les foies, mais avec des concentrations en PCBs beaucoup plus élevées. Il semble que l'augmentation de la concentration en PCBs dans les tissus des individus contaminés à l'Aroclor 1254 soit dose-dépendante. Le foie des têtards exposés à une faible concentration d'Aroclor 1254 (0,1 ppb) contient respectivement 223,41 µg/g et 18385,46 µg/g en équivalent d'Aroclor par rapport au poids frais et au poids de lipides. Le foie des individus issus de la dose 10 ppb contient 3107,76 µg/g et 142421,87 µg/g en équivalent d'Aroclor par rapport au poids frais et au poids de lipides.

Des échantillons d'eau et d'aliments ont également été analysés. Les résultats des analyses sont présentés dans le tableau III.3. Nous observons que l'eau est légèrement contaminée dans les contrôles 0 et DMSO (0,04 et 0,01 ppb de PCBs). La concentration en PCBs pour la condition 0,1 ppb est de 0,13 ppb. Celles des conditions 1 ppb et 10 ppb sont respectivement de 1,61 et 3,26 ppb de PCBs. La condition 1 ppb a reçu une dose plus élevée que celle qui était fixée. Par contre, l'eau de la condition 10 ppb présente une concentration en PCBs particulièrement faible. Concernant la nourriture, les analyses ont montré que chacun des aliments administrés aux animaux sont contaminés. Les larves de *Chironomidae* le sont fortement, avec une valeur s'élevant à 2473,77 µg de PCBs par grammes de lipides. Les valeurs pour les flocons et les spirulines sont également assez élevées : 891,12 µg/g de lipides pour les flocons et 786,09 µg/g pour les spirulines.

**Tableau III.3 :** Concentrations en PCBs (équivalent en Aroclor 1254) mesurées dans l'eau, les larves de *Chironomidae*, les flocons et spirulines. Les valeurs pour l'eau sont exprimées en ppb ; les valeurs pour la nourriture sont exprimées en µg/g de lipides.

	Eau (ppb)	Larves de <i>Chironomidae</i> (µg/g lipides)	Flocons (µg/g lipides)	Spirulines (µg/g lipides)
CTL 0	0,04	2473,77	891,12	786,09
DMSO	0,01			
0,1 ppb	0,13			
1 ppb	1,61			
10 ppb	3,26			

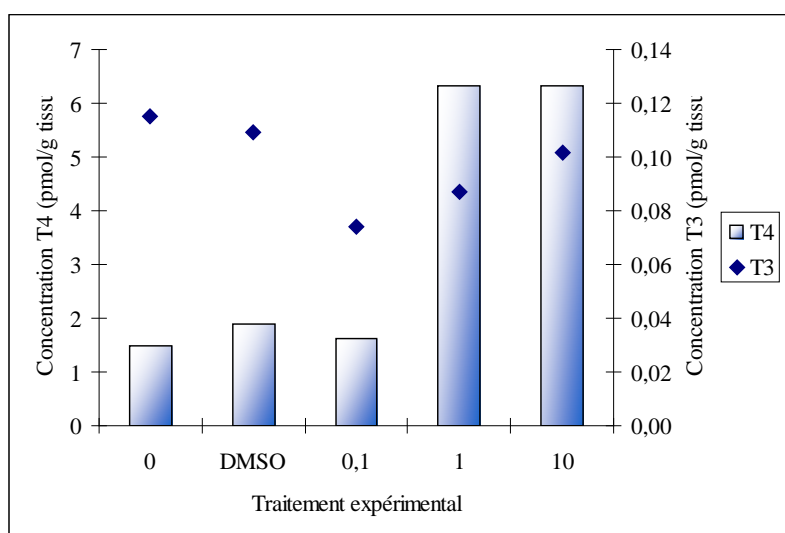
### 3. Evaluation du contenu en hormones thyroïdiennes dans différents organes

Pour rappel, l'extraction et le dosage des hormones thyroïdiennes ont été réalisés sur les cerveaux, les foies et les mâchoires inférieures des têtards du premier et du second prélèvement. Les organes ont été poolés pour chacune des conditions et pour chaque prélèvement afin d'obtenir une masse suffisante de tissu (300-500mg) pour permettre la réalisation de l'extraction et ensuite du dosage. Cette étude a été réalisée uniquement dans un but préliminaire. En absence de duplicats, seule une analyse qualitative des résultats obtenus peut être effectuée.

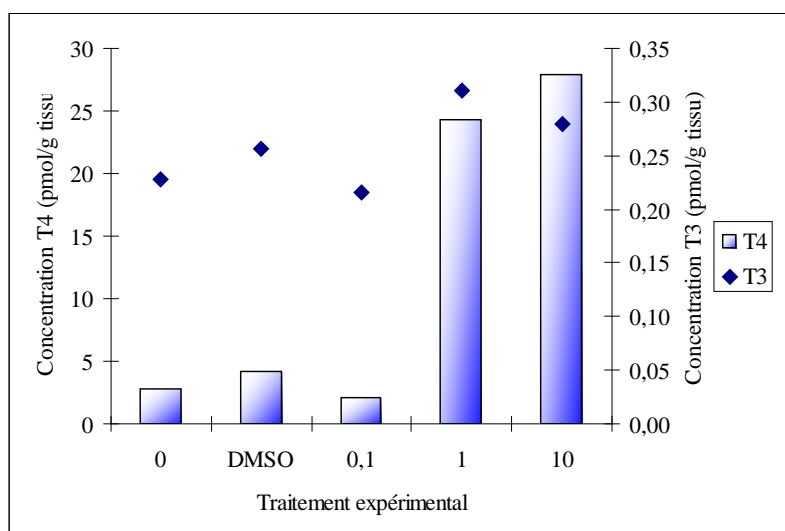
#### 3.1. Mâchoires inférieures

Les figures III.3 et III.4 représentent les concentrations en hormones thyroïdiennes T3 et T4 dans les mâchoires inférieures des têtards de xénopes en fonction de la condition expérimentale. L'extraction et le dosage ayant été réalisés sur un pool de 9 mâchoires, il y a absence d'écart-types. L'analyse de ce graphe ne pourra donc être que qualitative.

Nous observons une nette augmentation du contenu en T4 pour les conditions 1 ppb et 10 ppb de PCBs par rapport aux contrôles 0 et DMSO mais également par rapport à la condition 0,1 ppb pour le premier prélèvement (Figure III.3). Les valeurs s'élèvent à 6,326 et 6,320 pmol/g de tissu pour les conditions 1 et 10 ppb de PCBs respectivement. Celles du contrôle 0, DMSO et 0,1 ppb de PCBs sont de 1,481, 1,890 et 1,629 pmol/g de tissu. La concentration en T3 semble quant à elle rester relativement stable pour tous les traitements. En effet, les valeurs varient entre 0,115 pmol/g de tissu pour le contrôle 0 et 0,074 pmol/g de tissu pour 0,1 ppb. Les concentrations en T3 pour les conditions DMSO, 1 ppb et 10 ppb sont respectivement de 0,109, 0,087 et 0,102 pmol/g de tissus.



**Figure III.3 :** Concentrations en T3 et T4 dans la mâchoire inférieure de têtards issus du premier prélèvement, en fonction de la condition expérimentale. Les valeurs sont exprimées en pmol/g de tissu.



**Figure III.4 :** Concentrations en T3 et T4 dans la mâchoire inférieure de têtards issus du second prélèvement, en fonction de la condition expérimentale. Les valeurs sont exprimées en pmol/g de tissu.

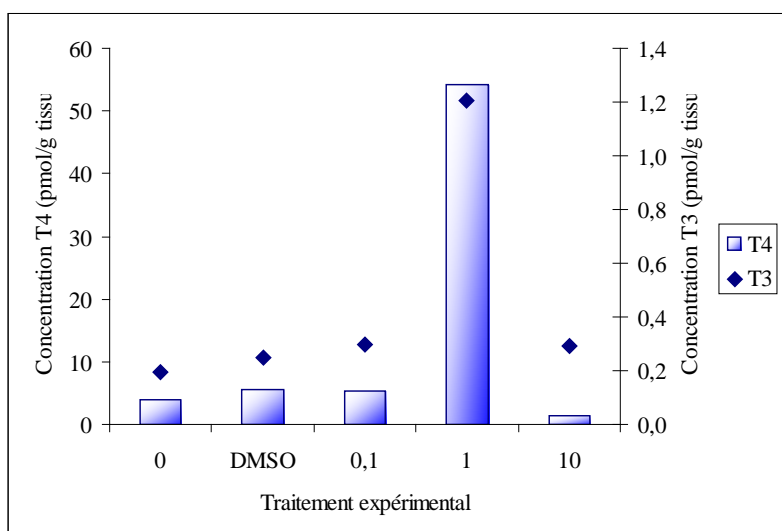
Les concentrations en THs dans les mâchoires inférieures des têtards issus du second prélèvement présentent le même profil que celui observé lors du premier prélèvement. On a prédominance de la T4 et ses concentrations sont à leurs niveaux les plus élevés pour les conditions 1 ppb et 10 ppb de PCBs. Les concentrations obtenues sont plus élevées que celles mesurées lors du P1. L'évolution de la T3 en fonction du traitement expérimental est semblable à celle du prélèvement 1 mais avec de nouveau des valeurs plus élevées. Elles sont de 0,228, 0,257, 0,215, 0,311 et 0,280 pmol/g de tissu pour le contrôle 0, DMSO, 0,1 ppb, 1 ppb et 10 ppb. Ces données sont représentées dans la figure III.4.

### 3.2. Foies

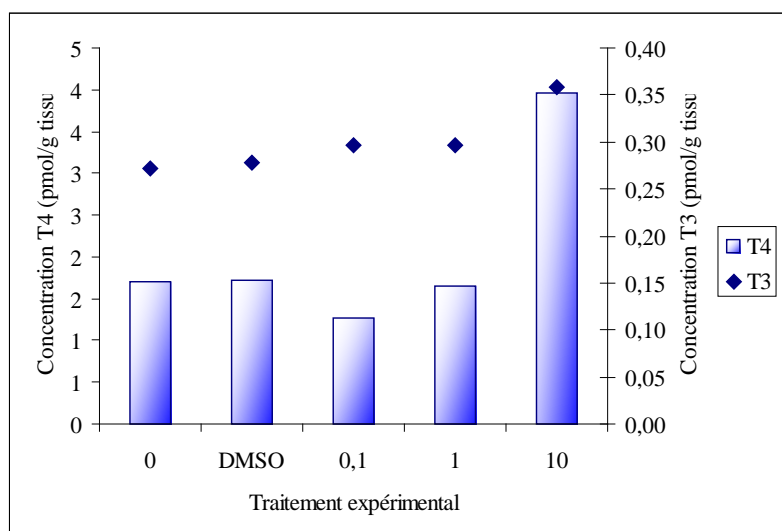
Les concentrations en hormones thyroïdiennes ont également été mesurées sur un pool de 9 foies de têtards de xénopes (Figures III.5 et III.6). Dans les foies du premier prélèvement (Figure III.5), les concentrations en hormones thyroïdiennes T3 et T4 sont beaucoup plus élevées que dans les mâchoires inférieures. En effet, nous avons des valeurs allant de 1,298 pmol/g tissu (10 ppb PCBs) à 54,198 pmol/g tissu (1 ppb PCBs) pour la T4. Pour la T3, nous nous trouvons dans une échelle qui se situe entre 0,195 pmol/g tissu (CTL 0) et 1,206 pmol/g tissu (1 ppb PCBs). Nous observons des valeurs très élevées pour la T3 et la T4 pour la condition 1 ppb de PCBs. La concentration en THs pour les autres conditions est relativement semblable.

Dans les foies du second prélèvement (Figure III.6), les concentrations en hormones thyroïdiennes T3 et T4 sont du même ordre de grandeur, même plus faibles, que dans les mâchoires inférieures, contrairement à ce qui était observé au prélèvement 1. Les concentrations en T4 sont de 1,711 (contrôle 0), 1,720 (DMSO), 1,265 (0,1 ppb), 1,649 (1 ppb), et nous observons une valeur maximale pour la condition 10 ppb de PCBs avec une concentration de 3,962 (10 ppb) pmol/g de tissu. Celles de T3 sont respectivement de 0,271, 0,279, 0,297, 0,297 et 0,358 pmol/g de tissu. La tendance pour cette hormone est toujours relativement stable. Nous remarquons une certaine constance dans les concentrations en T3 d'un prélèvement à l'autre. Par contre, concernant la T4, nous observons une nette diminution de sa concentration par rapport au P1.





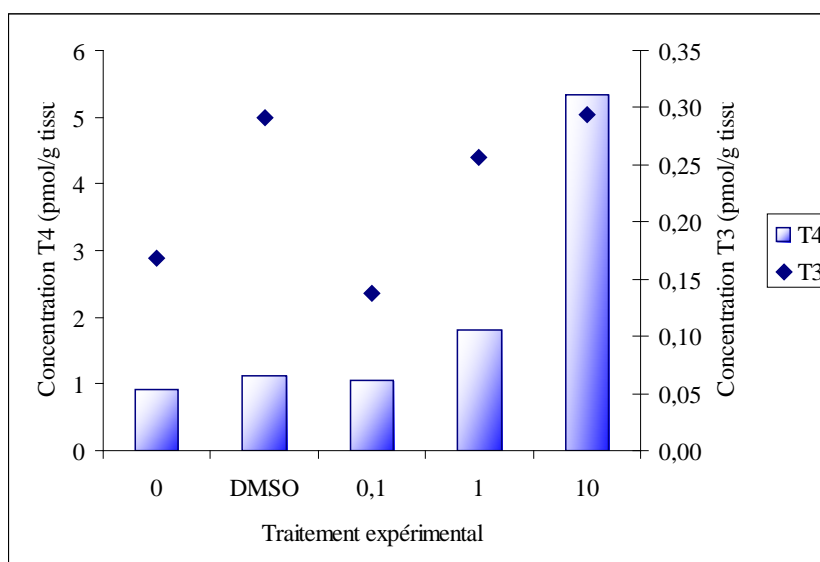
**Figure III.5 :** Concentrations en T3 et T4 dans le foie de têtards issus du premier prélèvement, en fonction de la condition expérimentale. Les valeurs sont exprimées en pmol/g de tissu.



**Figure III.6 :** Concentrations en T3 et T4 dans le foie de têtards issus du second prélèvement, en fonction de la condition expérimentale. Les valeurs sont exprimées en pmol/g de tissu.

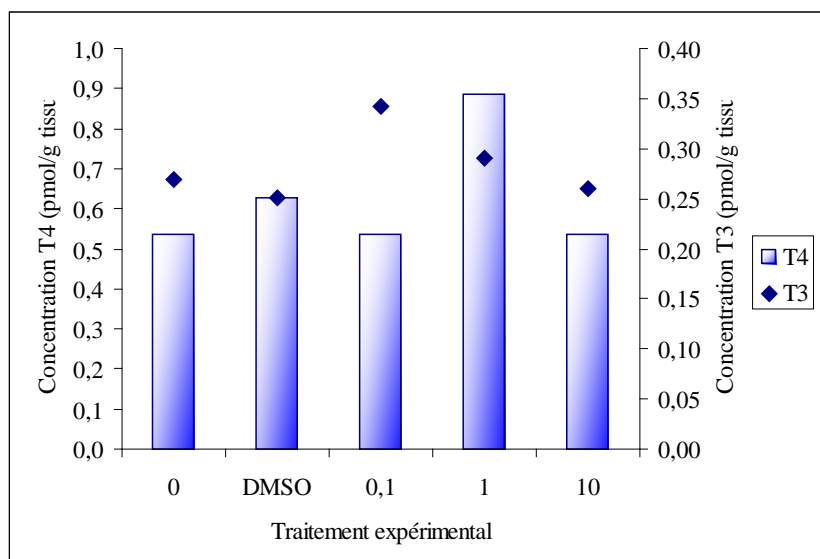
### 3.3. Cerveaux

Enfin, les concentrations en T3 et T4 ont été mesurées au sein de cerveaux de têtards (Figures III.7 et III.8). Un pool de 4 cerveaux a été réalisé. Pour le premier prélèvement, nous observons une concentration en T4 plus élevée pour la condition 10 ppb de PCBs (Figure III.7). Les valeurs de T4 pour le contrôle 0, le contrôle DMSO, les conditions 0,1 ppb et 1 ppb de PCBs sont respectivement de 0,912, 1,127, 1,048 et 1,818 pmol/g de tissu. L'évolution de la T3 n'est pas très stable et aucune conclusion ne peut en être tirée. Les concentrations sont du même ordre de grandeur pour la T4 que celles retrouvées dans les mâchoires inférieures. Par contre, pour la T3, les concentrations sont plus élevées mais moins que dans le foie.



**Figure III.7 :** Concentrations en T3 et T4 dans le cerveau de têtards issus du premier prélèvement, en fonction de la condition expérimentale. Les valeurs sont exprimées en pmol/g de tissu.

Dans les cerveaux du second prélèvement, nous observons des concentrations en T4 et en T3 assez stables (Figure III.8). La concentration en T4 est faible dans cet organe, comparé aux 2 autres (mâchoire inférieure et foie). Par contre, la concentration en T3 est du même ordre de grandeur que pour les autres organes. Nous observons une forte diminution de la T4 entre les deux prélèvements. Les valeurs de T3 et T4 sont respectivement de 0,269 et 0,538 pmol/g de tissu pour le contrôle 0, 0,251 et 0,627 pmol/g de tissu pour le contrôle solvant (DMSO), 0,342 et 0,535 pmol/g de tissu pour 0,1 ppb, 0,290 et 0,886 pmol/g de tissu pour 1 ppb et 0,260 et 0,537 pmol/g de tissu pour la condition 10 ppb de PCBs. Les valeurs semblent stables en fonction du traitement reçu.



**Figure III.8 :** Concentrations en T3 et T4 dans le cerveau de têtards issus du second prélèvement, en fonction de la condition expérimentale. Les valeurs sont exprimées en pmol/g de tissu.

#### 4. Analyse protéomique

Nous avons choisi, pour l'analyse protéomique, d'étudier 3 conditions expérimentales : le contrôle DMSO, 1 ppb et 10 ppb de PCBs. Vu le coût des sondes fluorescentes, nous avons préalablement réalisé des gels colorés à l'argent. Les échantillons protéiques chargés sur ces gels proviennent de cerveaux de têtards prélevés lors d'une manipulation d'essai menée fin 2006.

Les gels préliminaires nous ont permis d'apprendre la technique ainsi que de la maîtriser. Ils nous ont permis également d'obtenir les premières informations concernant les profils d'expression des protéines présentes au sein du système nerveux central des têtards de xénopes. Les premiers gels colorés à l'argent ont été réalisés dans une gamme de pH allant de 3 à 11 (Figure III.9). Nous remarquons la présence de nombreux spots apparaissant sur la totalité du gel. Cependant, une restriction de la gamme de pH utilisée était nécessaire afin d'augmenter la résolution de nos gels et de nous permettre de mieux séparer les protéines dans la zone ciblée. Nous avons donc utilisé une gamme de pH allant de 4 à 7 pour nos 2 derniers gels colorés à l'argent, en vue de visualiser le nouveau profil protéique obtenu (Figures III.10).

Nous avons ensuite réalisé 6 gels marqués aux cyanines (Figures III.11 et III.12). Deux de ces gels étant de nouveau impossibles à analyser, ces deux-là, uniquement, ont été refaits. Chaque gel renferme un standard interne qui permet de standardiser et normaliser les gels et d'avoir une « image » identique pour toutes les conditions. Nous pourrions alors faire des comparaisons entre les différents gels et entre les différentes conditions. Ce standard est marqué à la cyanine 2 et contient une quantité identique de toutes les protéines de toutes les conditions expérimentales. Chaque gel renferme également 2 conditions (par exemple, DMSO et 1 ppb). Une des 2 conditions est marquée à la cyanine 3 et l'autre à la cyanine 5. Nous avons choisi, pour des raisons statistiques, de travailler en quadruplicats.

Sur les 6 gels obtenus, 5 sont a priori parfaitement analysables. Cependant, l'un d'entre eux présente un étalement des spots sur une partie du gel, apparaissant sous la forme de traînées verticales, ce qui gêne l'analyse informatique avec le logiciel DeCyder. Une première étape de détection de tous les spots est suivie du *matching* pour chacun des gels. Un total de 3357 spots a été repéré sur un de gels. Celui-ci sera appelé *Master Gel* (c'est-à-dire le gel sur lequel il y a le plus de spots). Le nombre de spots détectés sur les autres gels est de 1627, 1643, 1663, 1761 et 1810. Une vérification manuelle, spot par spot, a lieu pour chacun des gels, par comparaison au *Master Gel*, afin de corriger les erreurs éventuelles de *matching*.

Pour déterminer les protéines qui sont sur- ou sous-exprimées, divers tests statistiques ont été réalisés. Tout d'abord, un rapport d'expression (*Average Ratio*) entre la condition 1 ppb PCBs et le contrôle DMSO est calculé. Ce facteur de variation d'abondance compare, au sein d'un même gel, les niveaux d'expression d'un même spot présent chez le contrôle et chez le test. Une valeur négative indique que la protéine est sous-exprimée dans la condition 1 ppb, par rapport au contrôle. Une valeur positive indique quant à elle que la protéine est sur-exprimée pour la condition test. Ce rapport d'expression est également calculé pour les conditions DMSO et 10 ppb. Lors de la comparaison 1 ppb versus DMSO, les variations d'expression de nos protéines d'intérêt sont de maximum 1,97 et de -2,47 respectivement pour les spots sur- ou sous-exprimés. Sur les 18 protéines d'intérêt, 11 sont sous-exprimées dans la condition 1 ppb. Les variations d'expression des protéines d'intérêt de la condition 10 ppb sont de maximum 2,01 et de -2,00 pour les spots sur- et sous-exprimés. Pour cette condition, 19 protéines sur les 28 sont sous-exprimées. On ne peut cependant pas se contenter de ce simple rapport pour définir les protéines qui bougent de manière significative au sein des gels. En effet, il représente une valeur moyenne entre les rapports calculés dans chaque gel. Une

variabilité inter-gel trop importante peut fausser nos interprétations, d'autant plus que dans notre cas, 2 gels ont été réalisés indépendamment des 4 autres et 1 des 6 gels est de mauvaise qualité.

Ensuite, pour affiner nos résultats, un test t de Student est réalisé. Ce test nous permettra de décider si les rapports d'expression observés sont significatifs ou non. Seules les protéines dont la valeur de t-Student est inférieure au seuil de 5 % sont retenues (Figures III.13 et III.14). Cependant, la variation de leur niveau d'expression sera à confirmer. Par contre, des valeurs de t-Student inférieures à 1 % pour certaines protéines d'intérêt indiquent que la variation d'expression de ces dernières est hautement significative. Sur les 18 spots sélectionnés de la condition 1 ppb, 5 ont des rapports d'expression hautement significatifs. C'est le cas notamment du spot n° 238 dont le rapport d'expression est de -1,39, soit une sous-expression de 39 % de la protéine concernée dans le cerveau des têtards de xénopes exposés à 1 ppb de PCBs. Dans le second test (10 ppb de PCBs), 9 protéines varient de manière hautement significative. Une représentation tridimensionnelle des spots permet de visualiser la variation d'expression d'une protéine donnée (Figure III.15).

De plus, seules les protéines se trouvant dans 15 ou 18 gels sur les 18 (6 gels → 3 photos par gel, correspondant chacune aux 3 longueurs d'onde des cyanines) sont retenues. Nous acceptons qu'elles ne se retrouvent que dans 15 des 18 gels en raison de la mauvaise qualité d'une large zone d'un de ceux-ci. Des spots trop étalés ne seront pas pris en compte dans l'analyse pour ce gel dans le but, évidemment, de ne pas fausser les résultats statistiques. Pour cela, chaque spot subit une vérification manuelle afin de vérifier que le *matching* dans chacun des 6 gels est bien correct. Si ce n'est pas le cas, le spot mal *matché* sera corrigé. Dans certains cas, la correction change fortement la valeur de t-Student et cette protéine pourra ne plus être sur- ou sous-exprimée de manière significative.

Les protéines d'intérêt dont l'expression varie significativement entre 2 conditions seront donc celles qui seront présentes dans 15 ou 18 gels et qui auront une valeur de t-Student < 0,05 (Tableaux III.4 et 5). Il est également important que le rapport d'expression pour un spot donné aille dans le même sens dans les gels analysés (Figure III.16).

Une fois les protéines d'intérêt définies, 3 gels colorés au krypton ont été réalisés (Figure III.17). Ces gels sont chargés avec une quantité plus importante de protéines et ils contiennent toutes les protéines de tous les échantillons. Ils serviront à prélever les protéines d'intérêt à l'aide d'un robot : l'Ettan Spot Picker (Amersham Biosciences). La coloration au krypton est préférée à la coloration au ruthénium uniquement en raison de la meilleure qualité de l'image obtenue. Ces gels sont scannés et envoyés également vers le programme DeCyder où une détection des spots ainsi que le *matching* ont lieu. Ensuite, une correction du *matching* est réalisée manuellement, tout comme avec les gels 2D-DIGE. Les protéines d'intérêt sont retrouvées dans les gels et annotées pour piquer. Ces spots seront ensuite prélevés à l'aide de l'Ettan Spot Picker (Figure III.18).

Les protéines seront ensuite envoyées à la spectrométrie de masse. Les échantillons des 3 gels seront poolés afin de maximiser la quantité de protéines correspondant au spot considéré et d'obtenir un signal suffisant à la spectrométrie de masse.

## 5. Identification des protéines

Nous avons excisé au total 34 spots correspondant à des protéines dont l'expression varie de manière significative entre les différentes conditions testées. Sur ces 34 spots, 12 représentent des protéines dont la variation d'expression est hautement significative. Les autres spots protéiques excisés représentent quant à eux des protéines dont la variation d'expression est

significative. Un total de 48 protéines différentes a été micro-séquéncé puis identifié par utilisation du nanoLC Q-tof 2 MS/MS et par recherche de similarité de séquence dans le MS BLAST. Un des spots sélectionnés (le spot n° 2473) n'a pas été analysé en raison d'un problème technique au niveau du spectromètre de masse. Cet échantillon n'a pas pu être récupéré. Deux autres n'ont pas été identifiés : les spots 1504 et 3202.

La banque de donnée utilisée dans NCBI est : *Xenopus*. Cette banque de données n'est cependant pas complète, le génome de *Xenopus laevis* n'ayant pas encore été entièrement séquéncé.

Le numéro du spot, le point isoélectrique (pI), la masse molaire (Mm), le score de Mowse, le facteur de variation, le nombre de peptides ms/ms, le code d'accension dans UNIPROT ainsi que l'identification de la protéine sont renseignés dans les tableaux III.6 et III.7. Les tableaux III.8 et III.9 reprennent quant à eux le numéro du spot, l'identification de la protéine et sa fonction.

Nous pouvons tout d'abord observer qu'un grand nombre de spots contiennent souvent des morceaux de séquences provenant de plusieurs protéines différentes. Au plus le nombre de peptides identifiés par le spectromètre de masse (*nb peptides ms/ms*) appartiennent à une protéine donnée est élevé, au plus la certitude que celle-ci est bien présente dans l'échantillon est grande. La présence par exemple d'un ou de deux peptides appartenant à une même protéine ne sera suffisante que si ceux-ci sont spécifiques de la protéine en question et ne se retrouvent pas, ensembles, dans une autre protéine. C'est pour cela que la vérification manuelle de chacune des séquences dans le MS-BLAST est importante. Le point isoélectrique ainsi que la masse moléculaire théoriques de la protéine identifiée sont vérifiés par comparaison avec la position du spot dans le gel afin d'éliminer des erreurs aberrantes dues, notamment, à des contaminations d'un spot à l'autre lors du passage des échantillons au spectromètre de masse. Cependant, il est important de préciser que ces deux critères sont théoriques et toujours mis à titre indicatif. En effet, les valeurs de pI et de Mm ne tiennent pas compte des modifications éventuelles de la protéine ; elles varient en fonction des isoformes mais également entre les banques de données.

Nous avons observé une sur- ou sous-expression significative ( $p < 0,05$ ) d'un total de 18 spots pour la condition 1 ppb de PCBs et de 30 spots pour les têtards soumis à 10 ppb de PCBs. Toutefois, parmi les 18 et les 30 spots sur- ou sous-exprimés de manière significative, seulement 5 et 9 spots, respectivement, présentent des niveaux de variation d'expression hautement significatifs ( $p < 0,01$ ) dans les 6 gels par rapport à la condition contrôle DMSO. Nous avons pu également remarquer que, pour les deux groupes traités, la plupart des protéines sont sous-exprimées par rapport au contrôle. En effet, 61 % des spots sont sous-exprimés pour la condition 1 ppb et 73 % pour la condition 10 ppb de PCBs.

Un total de 10 spots protéiques voient leurs niveaux d'expression modifiés à la fois dans la condition 1 ppb mais également dans la condition 10 ppb de PCBs. C'est le cas notamment des spots n° 238, 259 et 265. Nous remarquons cependant la présence de spots apparaissant uniquement dans l'une ou l'autre condition. De plus, nous pouvons observer que certains spots sont présents dans la condition 1 ppb mais pas dans la condition 10 ppb de PCBs et inversement. Une répartition des protéines par classes fonctionnelles peut être établie, celle-ci est illustrée par le tableau III.10.

# Quatrième partie

## Discussion

## Discussion

La discussion qui suit peut se résumer en trois parties distinctes, traitant respectivement de l'influence des PCBs sur le taux de survie, le poids et la morphologie des têtards, sur les niveaux en hormones thyroïdiennes T3 et T4 dans divers organes pour le premier et le second prélèvement et, pour finir, sur les profils d'expression des protéines du cerveau des têtards au stade 54/55 de la métamorphose.

### 1. Modifications des taux de survie, du poids et de la morphologie des têtards lors d'une exposition à long terme à l'Aroclor 1254

#### 1.1. Modification du taux de survie

De nombreuses études ont montré que les PCBs étaient responsables d'une diminution de la survie, et ce, essentiellement chez les organismes en développement. La plupart de ces études montrent un tel effet après de courtes durées d'exposition à des concentrations élevées en PCBs. D'après Fisher *et al.* (2003), une exposition durant 4 jours (du 5<sup>ème</sup> au 9<sup>ème</sup> jour PF) à de l'Aroclor 1254, à des concentrations de 10, 50 et 100 mg/l, suffit à produire une diminution significative du nombre de survivants chez des têtards de *Xenopus laevis*. Par contre, une exposition à une plus faible dose (1 mg/l) d'Aroclor 1254 ne produit aucun effet significatif sur le taux de survie. Peu avant, Gutleb *et al.* (2000) avaient également montré que des têtards de xénopes et de grenouilles rousses exposés à 2 et 200 mg/l d'une mixture de PCBs, le Clophen A50, présentaient une diminution de leur taux de survie. Dans d'autres études, Jelaso *et al.* (2002 et 2003) montrèrent une diminution de la survie chez des têtards de xénope en développement. Ceux-ci étaient exposés à 25 et 50 mg/l d'Aroclor 1254, du 11<sup>ème</sup> au 13<sup>ème</sup> jour PF. Des têtards exposés du 5<sup>ème</sup> au 7<sup>ème</sup> jour PF n'étaient, quant à eux, pas affectés. Récemment, Gillardin *et al.* (2007) ont observé qu'une contamination à court terme (72 heures) n'altérerait pas le taux de survie des têtards de xénope (5<sup>ème</sup> jour PF) pour des concentrations de 100 µg/l et 1 mg/l d'Aroclor 1254. Cependant, une contamination avec une dose de 10 mg/l (dose létale) provoque une mortalité très élevée.

Dans notre étude, la contamination avec la mixture de PCBs s'est étalée de J12 à J54 PF, avec des concentrations en PCBs nettement plus faibles que celles utilisées par les autres équipes de recherche. En effet, les doses utilisées sont respectivement de 0,1, 1 et 10 ppb d'Aroclor 1254 et correspondent à des concentrations fréquemment retrouvées dans l'environnement. Nous avons pu remarquer qu'après 21 jours, le taux de survie des têtards de *Xenopus laevis* arrivés au stade 54/55 n'était pas affecté, et ce pour chacune des conditions testées. Nous remarquons même un taux de survie de 100 % pour les têtards de la condition 1 ppb de PCBs. La mortalité n'est apparue qu'à partir du J22 PF, à savoir après 11 jours de contamination. Ensuite, nous observons qu'entre le premier et le second prélèvement (jusqu'au J46 PF ou 35<sup>ème</sup> jour de contamination), les taux de survie ont diminué pour les conditions 0,1 ppb et 1 ppb d'Aroclor 1254 passant de 96,3 et 100 % à 86,7 et 95,6 %. A partir du J46 jusqu'au J54 PF, une mortalité massive des têtards s'est produite avec des taux de survie s'élevant de 58,3 % pour le contrôle 0 à 22,2 % pour la condition 10 ppb de PCBs.

En 2000, Gutleb et ses collaborateurs ont réalisé une expérience de contamination à long terme avec des PCBs sur des têtards de xénope et de grenouille rousse. Ils ont exposé les têtards de xénopes arrivés au stade 50/51 (stade 25 pour la grenouille rousse) jusqu'à la métamorphose, avec des concentrations de 2 ou 200 mg/kg de Clophen A50 ou encore 0,2 mg/kg de PCB 126. Chez le xénope, la mortalité totale dans le groupe recevant la plus forte

dose de Clophen était de 42,5 %, contre 20,8 % pour le groupe contrôle. Une plus forte mortalité était observée chez le groupe recevant 2 mg/kg de Clophen A50 (40,0 %) et chez celui recevant le PCB 126 (40,8 %). Par contre, chez la grenouille rousse, la mortalité totale pour les têtards du groupe 200 mg/kg de Clophen A50 était plus élevée que celle des deux autres groupes. Dans cette expérience, les têtards des deux espèces montrent une augmentation de la mortalité corrélée à l'augmentation de la dose de PCBs reçue. Par contre, la même expérience, mais portée seulement sur 10 jours de contamination et sur le xénope uniquement, ne montre pas d'augmentation de la mortalité des têtards. Une hypothèse possible serait que les têtards se trouvant à des stades précédant le pic d'hormones thyroïdiennes endogènes seraient moins sensibles aux PCBs que ceux exposés plus tardivement, à des stades de développement dépendant de ces hormones (Gutleb *et al.*, 2000). La métamorphose des têtards chez les anoues implique une période de dégénération des pièces buccales larvaires et le développement des mâchoires de l'adulte, période durant laquelle les animaux ne sont plus capables de s'alimenter. Pendant ce stade de développement sans consommation de nourriture et avec des transformations tissulaires importantes chez le têtard, la masse graisseuse est mobilisée, relâchant des composés lipophiles, qui pourront alors exercer leurs effets toxiques (Gutleb *et al.*, 2000). Ce phénomène de mobilisation des graisses avec relâchement de xénobiotiques a déjà été mis en évidence chez des mammifères marins femelles en fin de période de lactation. Chez plusieurs espèces, les mères jeûnent pendant cette période. L'équipe de Debier (2003) a démontré qu'il y a augmentation des concentrations en PCBs dans la graisse maternelle avec la diminution du poids du corps, suggérant un effet de concentration des contaminants qui sont progressivement stockés dans une plus petite masse lipidique.

Cependant, dans notre étude, nous constatons que toutes les conditions expérimentales, y compris les contrôles 0 et DMSO, sont touchées par cette mortalité massive et soudaine. Diverses anomalies morphologiques et comportementales ont été observées. Tout d'abord, nous avons remarqué que la majorité, si pas la totalité, des têtards morts se trouvaient précisément au stade 62/63 de la métamorphose. La présence d'oedèmes dans la cavité abdominale et péricardique a également été observée. Les têtards moribonds n'étaient plus capables de nager et flottaient, ventre à l'air, à la surface de l'eau.

Concernant la mortalité des têtards arrivés au stade 62/63, deux hypothèses peuvent être suggérées. Celle-ci pourrait être due soit à un apport trop tardif de nourriture à base de vers de vase, soit à une alimentation des têtards avec des particules alimentaires qui concentreraient particulièrement les PCBs. Dans le deuxième cas, par un phénomène de bioaccumulation, il se peut que les PCBs se soient retrouvés à de plus grandes concentrations dans les individus et principalement dans les lipides. Rappelons toutefois que c'est via les branchies et la peau perméable que les PCBs pénètrent préférentiellement dans les organismes aquatiques (Safe, 1994). Si l'on regarde les résultats du dosage des PCBs dans l'alimentation des têtards, nous observons que celle-ci est fortement contaminée. Cependant, l'apport tardif de vers de vase serait l'explication la plus plausible. En effet, l'intestin subit un remodelage tissulaire important au cours de la métamorphose. Long et mince chez le têtard, il commence à se raccourcir aux alentours du stade 58 et ce processus continue jusqu'à la fin de la métamorphose. Après le stade 61, la formation des replis intestinaux prend place. Ces replis augmentent graduellement en nombre et en hauteur pour finalement être modifiés en replis zigzagant longitudinalement (Shi, 2000). Les têtards de notre expérience mourraient tous précisément au stade 62/63 de la métamorphose. A ce stade, le système digestif est devenu celui de l'adulte, adultes dont le régime alimentaire est carnivore et non plus herbivore. Il est donc probable que la mortalité massive des têtards soit due à cet apport trop tardif de nourriture d'origine animale. Cette mortalité s'étant étalée sur plusieurs jours, l'hypothèse



d'une mauvaise qualité de l'eau, par manque d'oxygène dissous ou par surplus de matières azotées, comme cause de cette diminution du taux de survie ne peut pas être avancée.

Plusieurs études ont détecté la présence d'oedèmes chez des têtards exposés aux PCBs. C'est le cas notamment de l'équipe de Gutleb qui, en 1999, a étudié les effets d'une contamination de femelles de *Xenopus laevis* au Clophen A50, sur le développement de leurs progénitures. Les concentrations en Clophen s'élevaient à 0,01, 1 et 25 mg/ml dans de l'huile de maïs, composé déposé à raison de 0,2 ml dans l'estomac des femelles durant 7 ou 14 jours avant la ponte. Les têtards issus de ces adultes contaminés présentaient des oedèmes déjà 24 heures après éclosion et l'incidence de ce phénomène augmentait chez les embryons à la fin de la période d'observation (96 heures). Au plus la concentration finale en Clophen A50 reçue par les femelles était élevée, au plus le nombre d'oedèmes était important. En 2000, cette même équipe a mis en évidence la présence d'oedèmes apparaissant lors d'une contamination à long terme de têtards de xénopes avec du Clophen A50 et du PCB 126. D'après Gutleb *et al.* (1999), le développement d'oedèmes semblerait être une réaction commune aux composés toxiques chez les amphibiens. Mima *et al.* (1992) ont exposé des têtards de xénopes à des concentrations en TCDD de 100, 200 et 400 ng/ml d'eau. Chez ces têtards, 77 % ont produit des oedèmes au jour 5 de contamination, et 76 % de ces animaux sont morts un peu plus tard durant le développement. Enfin, le PCB 126 induit une augmentation de l'hormone adrénocorticotrope (ACTH) et du cortisol chez la carpe (*Carpinus carpio*), qui coïncide avec le développement d'oedèmes, donnant ainsi la preuve d'effets possibles des PCBs sur l'équilibre hydrique (Stouthart *et al.*, 1998).

### 1.2. Modification du poids

Au cours de notre expérience, nous avons observé lors du premier prélèvement (stade 54/55) une augmentation significative (ANOVA ;  $p < 0,05$ ) du poids des têtards de la condition 10 ppb de PCBs par rapport aux autres conditions. Aucune différence significative de poids n'est décelée entre les conditions 0,1 ppb et 1 ppb de PCBs et les contrôles 0 et DMSO. L'augmentation de poids qui a été observée lors du premier prélèvement est suivie par un rétablissement de celui-ci entre le stade 54/55 et le stade 58 (2<sup>ème</sup> prélèvement). Lors des changements de nos milieux, avant le premier prélèvement, nous observions déjà à l'œil nu une augmentation de la taille des têtards issus des conditions traitées avec les doses les plus élevées de PCBs, par rapport aux contrôles. L'observation concernant cette hausse du poids des têtards n'est pas tout à fait en accord avec la littérature. En effet, toutes les études réalisées mettent en évidence une diminution du poids des têtards ou embryons exposés aux PCBs. Cependant, une seule publication étudiant les effets des PCBs sur la compétition interspécifique chez les amphibiens mentionne une augmentation du poids chez des têtards exposés. Glennemeier et Denver (2001) sont les seuls à avoir observé une augmentation du poids chez des têtards de *Rana pipiens* et de *Rana sylvatica* exposés à des PCBs. Les contaminations commençaient au stade 25/26 de la métamorphose. Les têtards étaient contaminés via l'alimentation, celle-ci contenant 1000 ng/g de 77-TCB. Après 7 jours de traitement, les animaux étaient pesés et la croissance relative était calculée. Les chercheurs remarquèrent qu'en absence de compétition, les têtards des deux espèces avaient une croissance supérieure quand ils étaient nourris avec de la nourriture contaminée au TCB. Parallèlement, une étude du contenu basal en corticostérone dans l'entièreté du corps a permis de fournir une explication possible à ce phénomène. En effet, une diminution du contenu basal en corticostérone causée par une exposition au TCB pourrait expliquer, en partie, l'augmentation de croissance qui est observée chez les têtards exposés puisque les corticostéroïdes sont connus pour inhiber la croissance chez la plupart des vertébrés. Une exposition chronique à de hauts niveaux de corticostérone endogène diminue la croissance

chez des têtards (Hayes et Wu, 1995 cités dans Glennemeier et Denver, 2001). Avec des niveaux en corticostérone plus faibles, on pourrait donc s'attendre à une augmentation de la croissance du têtard, bien que cette hypothèse n'ait pas été testée directement. Un traitement simultané avec du TCB et de la corticostérone endogène pourrait permettre de clarifier l'interaction qui pourrait exister entre corticostérone, croissance et polluant.

Le rétablissement du poids des têtards après le stade 54/55 est quant à lui difficilement explicable. Jelaso *et al.* (2003) montrèrent dans leurs différentes études que les têtards en développement présentaient une sensibilité différente à l'Aroclor 1254 en fonction de l'âge. En effet, des têtards âgés de 5 jours étaient résistants à des concentrations de plus de 50 mg/l d'Aroclor 1254, alors que des têtards de 11 jours montraient des changements dans l'expression des gènes après une exposition à des concentrations aussi faibles que 1 mg/l. Dans une de leurs études, ils démontrèrent que des têtards de 18 jours étaient 70 fois plus sensibles que ceux âgés de 11 jours. Cette découverte était en accord avec l'augmentation de la sensibilité dépendante de l'âge décrite par Binder et Baksi (en 1985 et 1986) chez les poissons et pourrait résulter de la présence d'un système P450-1A1 immature chez les jeunes têtards (Jelaso *et al.*, 2003). Rappelons que le cytochrome P450-1A1 (CYP-1A1) constitue une voie de métabolisation inductible qui intervient dans la dégradation partielle et la détoxification des PCBs. Dans certains cas, la dégradation des PCBs par le CYP-1A1 induit des produits dommageables qui peuvent être cytotoxiques, carcinogènes ou mutagènes. De nombreuses études ont montré que l'activité du P450-1A1 augmentait après une exposition aux PCBs. Guiney *et al.* (1997) ont montré que des jeunes poissons n'exprimaient pas les protéines du CYP-1A1 et étaient plus résistants à une exposition à la 2,3,7,8-TCDD que les poissons plus âgés. Ceci pourrait être une hypothèse quant à la tendance à la disparition de l'effet des PCBs sur le poids. Les jeunes têtards n'exprimant pas le CYP-1A1 au début de leur développement, ceux-ci seraient peu sensibles aux PCBs alors qu'en vieillissant, le cytochrome P450 se développe et les rend plus fragiles à ces toxiques, impliquant peut-être même un effet inverse des PCBs sur le poids.

### ***1.3. Altération de la morphologie de la queue des têtards***

Lors de notre expérimentation, nous avons pu observer chez un grand nombre de têtards des malformations au niveau de la queue. Nous avons également remarqué la présence de deux grenouilles possédant un membre surnuméraire, l'un au niveau des pattes antérieures et l'autre au niveau des pattes postérieures.

Les malformations au niveau de la queue sont observées chez pratiquement tous les individus des conditions 1 ppb et 10 ppb de PCBs. La condition 0,1 ppb est quant à elle moins touchée par ces anomalies. Cependant, le contrôle DMSO présente quelques individus malformés. Ce type de malformation est appelé « scoliose » et peut se définir comme étant un repliement latéral de la queue. Diverses études de contamination aiguë ont montré la présence de ces malformations chez les têtards. C'est le cas notamment de l'étude menée par Fisher *et al.* en 2003. Ils ont remarqué que, au plus la concentration en PCBs est élevée, au plus l'occurrence de malformations de la queue est grande, ce qui confirme nos observations. Cette équipe travaillait en contamination aiguë (exposition de 4 jours, de J5 à J9 PF, avec des doses de 10, 50 et 100 mg/l d'Aroclor 1254) sur des têtards de xénope. Jelaso et ses collaborateurs, en 2002, ont également observé ce phénomène chez des têtards de xénope exposés du J11 au J13 PF avec de l'Aroclor 1254. Dans notre expérience, les doses d'Aroclor étaient beaucoup plus faibles que celles utilisées dans les travaux existants, mais la contamination était plus longue. La durée de contamination pourrait donc avoir également une influence sur l'apparition des malformations. En effet, en 2000, l'équipe de Gutleb a observé la présence de nombreuses

scolioses lors d'une contamination à long terme avec du Clophen A50 et du PCB 126. Ce sont 67,3 % des individus traités avec 0,2 mg/kg de PCB 126 qui étaient malformés, contre 60,8 % de ceux soumis à 2 mg/kg de Clophen A50 et 58,8 % de ceux exposés à 200 mg/kg de Clophen. Dans cette étude, les chercheurs ont également remarqué la présence d'individus malformés parmi les contrôles DMSO (18,2 %).

Ce type d'anomalie morphologique au niveau de la queue peut s'expliquer par le fait que l'Aroclor 1254 induit des modifications histologiques dans la structure et l'organisation de celle-ci. En effet, des têtards exposés à l'Aroclor montrent une désorganisation des cellules musculaires, qui est corrélée avec l'apparition de scolioses ou de lordoses (queue repliée dorsalement) (Fisher *et al.*, 2003). Coletti *et al.* (2001) ont montré que l'exposition *in vitro* d'une lignée de cellules myogéniques de rat à de l'Aroclor 1254, diminuait la différenciation des muscles squelettiques et la fusion des myoblastes en myotubes, indiquant que, *in vivo*, le muscle en développement est une cible potentielle des PCBs. De plus, il a été démontré par diverses études que certains pesticides étaient capables d'engendrer des problèmes au niveau du métabolisme, provoquant des altérations de la minéralisation de l'ostéoïde. L'ostéoïde est une matrice extracellulaire de nature collagène synthétisée par l'ostéoblaste et qui subit une minéralisation au cours du développement. Ce problème de minéralisation est dû à la persistance de faibles niveaux en calcium et en phosphore. Une altération dans l'homéostasie du  $\text{Ca}^{2+}$  produit alors des défauts dans la composition de la matrice extracellulaire ainsi qu'une déficience au niveau de l'ossification, conduisant à des malformations squelettiques. Le simple mouvement de nage faisant que l'organisme prend la forme d'un S cause une tension latérale sur la notochorde qui est fragilisée et défective, ce qui peut contribuer à l'apparition de scolioses (Alvarez *et al.*, 1995). Il est donc possible que les PCBs agissent sur le métabolisme du calcium, comme le font certains pesticides.

Concernant la présence de membres surnuméraires, cela a rarement été observé dans les nombreuses études écotoxicologiques menées sur les amphibiens en laboratoire. Ce phénomène a pourtant attiré l'attention des scientifiques quand en 1995, un groupe d'écoliers du Minnesota découvre un grand nombre de grenouilles léopards (*Rana pipiens*) avec des anomalies hypermorphiques (doigts et/ou membres surnuméraires) et hypomorphiques (manque de doigts et/ou de membres) au niveau des membres (Gilliland *et al.*, 2001). Gardiner et Hoppe (1999) ont également observé de telles anomalies chez la grenouille du nord (*Rana septentrionalis*) en 1996 et 1997. Plusieurs agents causatifs ont été suggérés pour expliquer ce type de malformation, notamment une contamination chimique de l'eau (Burkhart *et al.*, 1998 cité dans Gilliland *et al.*, 2001). Une autre hypothèse serait la présence du trématode parasite *Ribeiroia* qui formerait un cyste au niveau du bourgeon du membre, et qui pourrait alors potentiellement provoquer des anomalies de ce type (Cohen, 2001 ; Gilliland *et al.*, 2001).

## 2. Effet d'une exposition à long terme à l'Aroclor 1254 sur les niveaux en hormones thyroïdiennes dans divers organes

Les hormones thyroïdiennes sont essentielles pour le métabolisme, la croissance, le développement et la reproduction. Les nombreuses études toxicologiques menées avec des PCBs ont montré l'existence d'une perturbation de la fonction normale de la thyroïde chez les animaux de laboratoire exposés à ce type de polluant (Fisher *et al.*, 2006). Il a également été mentionné que des perturbations des niveaux en hormones thyroïdiennes pouvaient impliquer des déficits neurodéveloppementaux et neurocomportementaux chez les enfants. Les effets de contaminations par les PCBs seraient semblables à ceux observés chez des individus souffrant d'hypothyroïdie. La plupart des études menées sur les amphibiens et étudiant le contenu en

hormones thyroïdiennes T3 et T4 ont été réalisées sur des homogénats totaux ainsi que sur le plasma. Dans notre expérience, les concentrations en THs ont été mesurées sur divers organes : le foie, la mâchoire inférieure et le cerveau. Aucune donnée chiffrée n'existe pour ces organes, aucune comparaison quantitative ne pourra donc être effectuée. De plus, comme il a été mentionné précédemment, en l'absence de duplicats, seule une analyse qualitative peut être réalisée.

Lors de notre premier prélèvement, les têtards se trouvaient aux alentours du stade 54/55 de la métamorphose, stade appartenant à la prémétamorphose, étape durant laquelle les hormones thyroïdiennes sont présentes en très faible concentration. Le second prélèvement a eu lieu quant à lui durant la prométamorphose. Cette étape est caractérisée par la synthèse de THs endogènes permettant ainsi l'augmentation des niveaux en T3 et T4 dans le plasma. C'est au climax métamorphique que les niveaux en THs sont les plus élevés, après quoi, ceux-ci retombent à leurs niveaux basaux comme chez les têtards prémétamorphiques (Shi, 2000 ; Krain et Denver, 2004). Ces faibles concentrations en T3 et T4 circulantes à la fois chez les têtards en prémétamorphose et chez les adultes suggèrent que les hormones thyroïdiennes chez les amphibiens anoures sont d'une plus grande importance durant la métamorphose (Regard *et al.*, 1978).

Tout d'abord, nous observons dans les échantillons de mâchoires inférieures que les niveaux en T3 et T4 augmentent fortement entre le stade 54/55 (prélèvement 1) et le stade 58 (prélèvement 2), ce qui est en accord avec la littérature. Cela pourrait montrer qu'il y a activation du système thyroïdien caractéristique de la métamorphose chez les anoures, et donc production de T3 et de T4 (Krain et Denver, 2004). De plus, c'est au sein de cet organe que la thyroïde, organe diffus chez les amphibiens, se situe. Par contre, la situation est quelque peu différente pour le foie et le cerveau des têtards. En effet, nous remarquons que dans ces deux organes, les niveaux en T4 chutent d'un prélèvement à l'autre. Concernant les niveaux en T3, nous ne pouvons pas détecter de changements majeurs entre les deux stades de développement. En absence de duplicats, les différences trouvées pour les niveaux en T3 et T4 peuvent ne pas être significatives. Ces résultats demanderont donc confirmation et aucune hypothèse sensée ne peut être émise.

Ensuite, dans les mâchoires inférieures, nous observons que les concentrations en T4 sont plus élevées chez les têtards qui ont été exposés aux PCBs. Dans le foie, la tendance est moins nette. Pour le prélèvement 1, la condition 1 ppb de PCBs montre des valeurs de T3 et T4 très élevées. Il faut donc rester prudent quant à de tels résultats. En effet, une erreur de manipulation pourrait peut-être être à l'origine de ces valeurs particulièrement élevées. Concernant le cerveau, le premier prélèvement montre une augmentation du contenu en T4 en fonction de la dose de PCBs reçue. Globalement, les niveaux en T3 restent stables entre les contrôles et les contaminés, avec des valeurs beaucoup moins élevées que celles obtenues pour les concentrations en T4. Toutes les études menées sur le plasma de têtards (ou autres organismes en développement) contaminés par des congénères de PCBs non-*ortho*, mono-*ortho* et di-*ortho* chlorés mentionnent une diminution des niveaux en T4 après exposition, cela étant dû notamment à la liaison de la T4 à la transthyrétine, réduisant la disponibilité de celle-ci sous sa forme libre (Burgin *et al.*, 2001). Dans notre situation, on pourrait peut-être envisager qu'il y ait eu diminution de l'expression des gènes codant pour la TTR induisant ainsi une augmentation de la concentration en T4.

Enfin, nous pouvons également remarquer que les concentrations en hormones thyroïdiennes sont différentes en fonction de l'organe isolé (les comparaisons sont effectuées sur base du poids frais). Durant la prémétamorphose, les concentrations en T4 sont plus élevées dans le foie que dans le cerveau et la mâchoire inférieure. Celles dans la mâchoire et dans le cerveau

sont semblables. En ce qui concerne la T3, sa concentration est globalement identique dans tous les organes. Arrivés au stade 58, nous observons que la tendance est différente pour la T4. En effet, sa concentration est plus élevée dans la mâchoire inférieure que dans le foie, lui-même présentant une quantité de T4 plus élevée que dans le cerveau. La T3 est de nouveau présente dans des mêmes proportions dans tous les organes.

Les THs sont sécrétées à partir de la glande thyroïde et sont ensuite amenées aux différents organes et tissus où elles exerceront leurs effets biologiques (Shi, 2000). La T4 peut aussi être convertie en T3 dans divers tissus par la 5'-déiodinase. De plus, à la fois la T4 et la T3 peuvent être rendues inactives via l'action de 5-déiodinases, produisant respectivement de la T2 et de la reverse-T3. En conséquence, les ratios de T3 et de T4 et les niveaux cellulaires de celles-ci peuvent varier d'un tissu à un autre, en fonction de la présence des diverses déiodinases. En effet, ces dernières possèdent des propriétés enzymatiques et une distribution différentes chez les mammifères. Elles possèdent également des profils de régulation différents dans divers organes, supportant l'idée que les niveaux en hormones thyroïdiennes peuvent varier selon les tissus (Shi, 2000). En 2000, Hulbert a mesuré les concentrations en T3 et T4 dans divers tissus chez le rat. Il a observé que le contenu en T4 dans le foie est supérieur à celui dans la thyroïde, elle-même présentant une concentration en T4 supérieure à celle trouvée dans le cerveau, ce qui maintient l'hypothèse d'une distribution différente des THs. Enfin, Brown et Cai (2007) montrèrent que les cellules du cerveau expriment de hauts niveaux constitutifs de 5'-déiodinase de type 2 (DI-2) (Cai et Brown, 2004). La conversion locale de la T4 en T3 active catalysée par la DI-2 joue un rôle important dans la sensibilité du cerveau à de faibles niveaux de THs circulantes. Cela pourrait expliquer la présence de faibles concentrations en T3 et T4 dans le cerveau, en comparaison avec les deux autres organes. De plus, Cai et Brown (2004) ont montré que l'expression de la DI-2 dans les cellules ventriculaires du cerveau est déjà active chez les embryons bien avant que l'animal ne commence à synthétiser les THs endogènes.

Krain et Denver (2004) ont observé que le contenu en T3 dans l'ensemble du corps était moins élevé que celui en T4 et ne montrait pas d'élévation significative jusqu'au stade 62. Cette observation a également été faite par Tata (1993) et pourrait expliquer la présence d'une concentration en T3 proche dans les trois organes isolés dans notre expérimentation.

### 3. Dosage des PCBs dans les organismes de *Xenopus laevis* exposés à l'Aroclor 1254 ainsi que dans l'eau et l'alimentation

Les concentrations en PCBs ont été évaluées dans le foie et la queue de têtards de xénopes par rapport au poids frais total et au poids de lipides. Remarquons tout d'abord que les PCBs sont présents à des concentrations de 44,90 µg/g de poids frais dans la queue et 113,19 µg/g de poids frais dans le foie des têtards du contrôle 0. Ces valeurs sont respectivement de 16,64 et 125,43 µg/g de poids frais pour le contrôle DMSO. Nos contrôles sont donc contaminés par des PCBs. Plusieurs voies de contamination sont possibles. Tout d'abord, la voie trophique peut être envisagée. En effet, les analyses faites sur l'alimentation des géniteurs ont montré qu'il y avait une très forte contamination de la nourriture. La concentration en PCBs dans les vers de vase s'élève à 2473,77 µg/g de lipides, ce qui est conséquent. Glennemeier et Begnoche (2002) ont montré que des larves de *Chironomidae* (vers de vase) prélevées dans les Grands Lacs contenaient de 2,5 à 32 fois plus de PCBs que les niveaux mesurés dans les sédiments. Ces organismes concentrent donc fortement les polluants. Les adultes sont donc contaminés malgré leur maintien dans des conditions en vase clos. La contamination des têtards de nos contrôles pourrait également provenir des aliments pour poissons utilisés comme source de nourriture végétale. En effet, il s'avère que les spirulines et les flocons de la

firmes Sera sont eux aussi contaminés par les PCBs. Les concentrations sont respectivement de 786,09 et 891,12  $\mu\text{g/g}$  de lipides. Cependant, Jelaso *et al.* (2002) ont rapporté qu'une accumulation de PCBs dans les larves de xénopes, suite à une contamination par de l'Aroclor 1254, est plus rapide lorsque les larves sont exposées à des PCBs dissout dans l'eau qu'à travers leur alimentation. En effet, l'incorporation par les branchies est plus efficace qu'une ingestion par voie alimentaire (Fisher *et al.*, 2003). Dans ce dernier cas, les PCBs sont d'abord transportés à travers l'épithélium intestinal via une diffusion passive avant de gagner le flux sanguin.

Par rapport au groupe contrôle DMSO, nous observons une augmentation de l'ordre de 4,5 fois pour le groupe 0,1 ppb, avec des valeurs de 44,90  $\mu\text{g/g}$  de poids frais et 21441,90  $\mu\text{g/g}$  de lipides dans la queue. Dans le foie, l'augmentation est moins marquée et est de l'ordre de 1,8 fois. Pour le groupe 1 ppb, nous obtenons des valeurs augmentées d'un facteur 2 pour la queue et le foie, avec des valeurs respectivement de 198,01 et 439,87  $\mu\text{g/g}$  de poids frais. La condition 10 ppb voit ses valeurs augmenter de l'ordre d'un facteur 7 dans les deux tissus, par rapport à la condition 1 ppb de PCBs.

Au vu de ces résultats, nous pouvons affirmer que les PCBs augmentent de façon dose-dépendante dans les tissus des têtards contaminés. Les taux de PCBs sont plus élevés quand ils sont exprimés par rapport au poids des lipides. En effet, les PCBs (et essentiellement les congénères hautement chlorés) sont des substances lipophiles. Ils ont donc tendance à s'accumuler dans les tissus riches en lipides (Carlsson *et al.*, 2007). Nous avons retrouvé de fortes concentrations de PCBs dans les tissus, cela étant probablement dû à l'exposition à long terme de ces têtards. De plus, nous pouvons remarquer que, pour toutes les conditions expérimentales, les concentrations en PCBs mesurées dans les queues des têtards sont moins élevées que celles mesurées dans les foies. Les niveaux élevés dans le foie sont probablement dus à un haut débit sanguin transportant la substance jusqu'à cet organe, résultant en des concentrations élevées du polluant à cet endroit. De plus, les tissus adipeux chez le têtard, contrairement à la grenouille, sont peu disponibles pour les PCBs et une grande partie du polluant est transportée jusqu'au foie où il va être accumulé et ensuite métabolisé avant d'être excrété (Burreau *et al.*, 2000). Ce phénomène d'accumulation du polluant suivi par son métabolisme pourrait être responsable de l'apport important du composé chimique dans le foie. Dans les autres tissus, comme la queue, la présence du polluant est due à l'affinité de ce dernier pour les lipides ou les structures pigmentaires (Carlsson *et al.*, 2007). Il faut cependant rappeler que le foie des têtards provient d'individus du troisième prélèvement alors que les échantillons de queues proviennent du premier prélèvement. Il est donc probable que les différences observées au niveau des concentrations en PCBs dans la queue et le foie soient dues à une durée de contamination différente.

#### 4. Modification de l'expression des protéines suite à une exposition aux PCBs

Afin d'aller plus loin dans la compréhension des mécanismes d'action des PCBs au niveau du système nerveux central, nous avons entrepris d'analyser le niveau d'expression des protéines par la technique du 2D-DIGE. Notre travail a permis dans un premier temps d'apprendre à isoler les différents organes chez des têtards, dont le cerveau, élément central de notre étude, et dans un deuxième temps d'étudier des variations de l'expression des protéines au sein de cet organe chez des têtards se trouvant au stade 54/55 de la métamorphose et ayant été soumis à une exposition à 1 ppb et 10 ppb de PCBs à partir du J12 PF.

Nous avons tout d'abord observé une sur- ou sous-expression significative d'un total de 18 spots pour la condition 1 ppb de PCBs et de 28 spots pour les têtards soumis à 10 ppb de PCBs. Cependant, on pourrait se demander dans quelle mesure les modifications de

l'expression des protéines, suite à une exposition aux PCBs, sont réellement dues à une modification de la transcription des gènes correspondants. En effet, divers paramètres interviennent dans la présence et la quantité de protéines dans une cellule. C'est le cas notamment des niveaux de transcription du gène, de l'exportation de l'ARNm dans le cytoplasme, de la régulation de la traduction, des modifications post-traductionnelles ainsi que de la dégradation de la protéine (Graves et Haystead, 2002). Rien ne peut nous permettre d'affirmer que les sous-expressions observées ne soient le résultat de la répression du gène codant pour cette protéine. Cette diminution d'expression pourrait également être le résultat de la dégradation de la protéine (pouvant être oxydée par les PCBs) par un centre protéolytique. Pour éliminer toute ambiguïté de ce genre, une étude transcriptomique parallèle serait nécessaire afin de voir si la quantité d'ARNm codant pour les protéines sur- ou sous-exprimées est modifiée, ce qui reflèterait les taux de transcription des gènes correspondants.

Nous avons pu également remarquer que, pour les deux groupes traités, la plupart des protéines sont sous-exprimées par rapport au contrôle DMSO. En effet, 61 % des spots sont sous-exprimés pour la condition 1 ppb. Pour la condition 10 ppb, ce pourcentage s'élève à 73 %. Les PCBs auraient-ils tendance à diminuer la transcription des gènes au sein du cerveau, et par là même diminuer les niveaux d'expression des protéines? En 2002, Jelaso et ses collaborateurs ont associé des profils d'expression de certains gènes comme étant des biomarqueurs d'effets sur la santé suite à une exposition à court terme (deux jours) de têtards de xénopes à de l'Aroclor 1254. Par exemple, il a été établi que les PCBs affectent le développement neural et le système endocrinien ; ils ont donc sélectionné un certain nombre de gènes connus pour contrôler le développement neural et la fonction endocrine et essayé de détecter parmi eux des biomarqueurs moléculaires pour des changements induits par les PCBs. C'est ainsi qu'ils ont sélectionné 11 gènes biomarqueurs. Des têtards exposés du 11<sup>ème</sup> au 13<sup>ème</sup> jour PF à des doses de 10, 25 et 50 mg/l d'Aroclor 1254 présentaient des diminutions dans l'expression de 9 gènes sur 11, incluant des gènes impliqués dans la fonction neurologique tels que le NGF (Nerve Growth Factor). Cette diminution est également obtenue lors d'une exposition à 1 mg/l d'Aroclor 1254 mais cette fois seulement chez 4 des 11 gènes. Avant le 11<sup>ème</sup> jour PF, il n'y aurait pas d'effet des PCBs sur l'expression des gènes. Rappelons que le NGF est important pour la croissance, la différenciation et la survie des neurones en développement. Une réduction de son niveau d'expression pourrait donc jouer un rôle dans les déficits neurodéveloppementaux induits par les PCBs. Une exposition à 500 et 700 µg/l d'Aroclor 1254 sur ces mêmes têtards (Jelaso *et al.*, 2003) produit également une diminution des niveaux d'expression de certaines protéines. Ces études ont donc observé, tout comme nous, une sous-expression d'un grand nombre de protéines, notamment du cerveau, après une exposition à de l'Aroclor 1254. Ce phénomène pourrait peut-être être associé aux nombreux déficits neurocomportementaux et neurodéveloppementaux décrits suite à ce type d'exposition. Une dégradation de la protéine par un centre protéolytique, comme mentionné précédemment, pourrait être également la cause d'une telle observation.

Une fois encore, l'approche protéomique fournit la preuve qu'un agent toxique est en mesure d'affecter les profils d'expression des protéines dans les tissus d'organismes aquatiques exposés. Des conclusions similaires ont déjà été tirées par des études menées sur les mollusques et les poissons dont les tissus étaient exposés à des polluants tels que le cadmium, le zinc ou encore les PCBs (Shepard *et al.*, 2000, Schrader *et al.*, 2003 cités dans Silvestre *et al.*, 2006). Cependant, un des problèmes majeurs lorsque l'on étudie des animaux sauvages à un niveau protéomique est la disparité génétique qui peut induire une forte variabilité dans les profils d'expression des protéines. Il faut donc toujours garder une certaine distance par rapport à ce qui est observé. Malgré le fait que la protéomique devienne courante au sein de la communauté scientifique, la plupart des études réalisées jusqu'à présent se sont focalisées sur

la découverte de médicaments, l'identification de biomarqueurs et d'interactions entre protéines dans le cadre de processus pathologiques chez l'homme (Silvestre *et al.*, 2006).

Un des avantages de l'analyse en 2D-DIGE est la diminution du nombre de gels à effectuer. En effet, un total de 6 gels a été réalisé, chacun comprenant un standard interne regroupant les différents échantillons utilisés, ainsi que deux conditions expérimentales. Cependant, cette technique est extrêmement sensible (beaucoup plus qu'avec la coloration à l'argent). Une extrême précision à chaque étape est nécessaire pour le bon fonctionnement et la réussite des gels colorés aux cyanines. Les gels réalisés auraient dû être tous parfaitement réussis afin de limiter au maximum une variabilité inter-gels. Or, dans notre étude, l'un d'entre eux était de moins bonne qualité que les autres, il faut donc rester prudent quant aux conclusions tirées dans notre travail. Une variabilité inter-gels trop importante pourrait conduire à des erreurs de *matching*, elle pourrait également indiquer des niveaux d'expression des protéines plus faibles que les niveaux réels suite, par exemple, à un étalement du spot considéré. Le nombre de réplicats devrait être encore augmenté pour permettre de confirmer les tendances observées et ainsi d'améliorer les valeurs de t-Student obtenues. Le gel dont la qualité est moins bonne devrait être refait pour diminuer la variabilité inter-gels. La reproductibilité d'une telle méthode n'est pas toujours excellente. En effet, nous pouvons remarquer que certains spots n'évoluent pas tous dans le même sens.

Nous avons également pu identifier les protéines d'intérêt à l'aide d'une analyse faite suite à un microséquençage par nanoLC MS/MS et à une recherche par similarité de séquence dans MS-BLAST. Nous avons détecté la présence de 47 protéines différentes pour les 34 spots piqués. Normalement, nous aurions dû observer une seule protéine par spot. En effet, l'analyse en deux dimensions permet de séparer celles-ci d'abord selon leur point isoélectrique, et ensuite suivant leur poids moléculaire. Or, dans nos résultats, nous remarquons que pour le spot n° 1724, par exemple, un total de 4 protéines différentes a été microséquencé. Ce type d'observation a également été fait pour d'autres spots. Plusieurs raisons peuvent être évoquées. La première est que, pour obtenir un signal en spectrométrie de masse, nous avons besoin d'une quantité suffisante de protéines. Pour s'assurer ce signal, nous avons donc réalisé trois gels colorés au krypton sur lesquels les spots ont été excisés. Les spots correspondants ont ensuite été poolés entre eux. Une excision un peu décalée pour l'un a pu éventuellement provoquer une contamination de la solution envoyée par la suite au spectromètre de masse, et ainsi faire apparaître des protéines différentes de celles des deux autres spots. La seconde raison évoquée serait que les protéines présentes au sein du système nerveux des amphibiens sont en nombre très élevé. Une protéine pourrait ainsi en masquer plusieurs autres. Lors du piquage de cette dernière, on n'excise pas une seule protéine mais plusieurs. Il serait donc intéressant dans ce cas de réaliser des gels dans une gamme de pH encore plus restreinte afin d'augmenter la résolution des gels. Enfin, la dernière raison possible serait une surcharge protéique du gel qui se visualiserait par la présence de gros spots qui en masqueraient d'autres.

Parmi les 47 protéines identifiées, 8 semblent être particulièrement intéressantes dans leur implication au sein du système nerveux central. Rappelons qu'un certain nombre de congénères de PCBs sont connus pour être neurotoxiques (Cravedi et Narbonne, 2003 ; Malkiewicz *et al.*, 2006) et que l'exposition à ces substances est souvent associée à des changements cognitifs et comportementaux, ainsi qu'à des déficits neurodéveloppementaux et neurologiques. De plus, les concentrations en hormones thyroïdiennes sont également affectées par ces polluants. La sur- et/ou sous-expression de certaines protéines pourrait donc appuyer ces faits et permettre leur mise en relation.



Gillardin *et al.* (2007) ont réalisé une analyse protéomique sur des homogénats totaux de têtards exposés durant 72 heures (stress aigu) à de fortes doses d'Aroclor 1254 (0,1 et 1 mg/l). L'analyse en spectrométrie de masse leur a permis d'identifier les protéines dont les niveaux d'expression varient de manière significative pour les deux conditions étudiées. Un certain nombre de protéines identifiées lors de cette étude sont identiques à celles identifiées dans notre expérience. Ce sont les protéines suivantes : keratin type II cytoskeletal I, creatine kinase muscle and brain, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B et proteasome activator subunit 3.

Nous avons pu observer la présence de 10 spots dont les niveaux d'expression sont modifiés à la fois dans la condition 1 ppb mais également dans la condition 10 ppb de PCBs. Parmi eux, les spots n° 667, 680 et 1568 semblent être intéressants et correspondent respectivement aux protéines suivantes : le *Xenopus* nuclear factor 7 (Xnf 7), la Heat shock protein 74kDa (Hsp74) et la créatine kinase du cerveau (BCK).

Nous avons également détecté la présence de variations dans l'expression de diverses protéines impliquées dans des maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson ou la maladie d'Alzheimer. Ces maladies sont souvent associées à la présence d'un stress oxydatif provoqué notamment par une altération de l'expression de plusieurs enzymes anti-oxydantes, ce qui conduit à des dommages cellulaires. Une augmentation de l'expression de certaines protéines du cerveau pourrait être due notamment à une diminution du renouvellement protéique, phénomène qui est également observé dans ce type de pathologies. Enfin, une association entre une altération du métabolisme énergétique, une diminution de la fonction synaptique et un stress oxydatif a été proposée dans le cadre de ces maladies (Butterfield *et al.*, 2003). Nous parlerons donc également de la peroxiredoxine de type VI (Prx-VI), des heat shock proteins (Hsp), de la glyoxalase de type I et de la dihydrolipoamide S-succinyltransférase (DLST).

Rappelons tout d'abord que les maladies neurodégénératives sont des pathologies qui trouvent leur origine dans la dégénérescence des neurones du système nerveux central. La maladie de Parkinson est due à la perte de neurones dopaminergiques résultant en une déficience de dopamine dans le cerveau, hormone permettant le contrôle des mouvements. Elle se caractérise donc par des symptômes moteurs mais également parfois par des atteintes intellectuelles comme la détérioration de la mémoire<sup>9</sup>. La maladie d'Alzheimer est quant à elle due à la perte de neurones cholinergiques. Cette maladie revêt un caractère génétique et se caractérise par une perte de la mémoire ainsi que des troubles divers du comportement<sup>10</sup>.

#### Altération de l'expression de protéines anti-oxydantes.

Après une exposition à 1 ppb de PCBs, nous observons que la peroxiredoxine de type VI est sur-exprimée de manière significative dans le cerveau des têtards arrivés au stade 54/55 de la métamorphose. Les peroxiredoxines (Prxs) appartiennent à une famille d'enzymes anti-oxydantes qui est hautement conservée et ces protéines sont largement distribuées dans la plupart des tissus. Une augmentation de leur expression est observée dans le cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Les peroxiredoxines jouent un rôle anti-oxydant important dans la protection des neurones contre des dommages induits par le peroxyde d'hydrogène (Jin *et al.*, 2005). Une sur-expression de ces enzymes est en concordance avec le rôle des espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans la pathologie de la maladie d'Alzheimer (Butterfield *et al.*, 2003). En effet, il a été démontré que la génération de ces ROS par un stress oxydant est impliquée dans de nombreuses conditions pathologiques du cerveau,

<sup>9</sup> <http://www.med.univ-rennes1.fr/sisrai/dico/S104.html>

<sup>10</sup> <http://www.alzheimer-paris.org>

comme les maladies neurodégénératives incluant la maladie de Parkinson, d'Alzheimer et la sclérose latérale amyotrophique (Krapfenbauer *et al.*, 2003 ; Jin *et al.*, 2005). La réduction de l'oxygène durant le métabolisme normal produit ces réactifs ROS tels que l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène et les radicaux hydroxyles. Ces ROS sont chimiquement très réactifs et provoquent des dommages aux composants intracellulaires, particulièrement quand ils sont produites en excès. Cependant, des niveaux modérés de ROS intracellulaires sont nécessaires pour la régulation des fonctions cellulaires, incluant l'expression de gènes aussi bien que leur traduction. Il est donc impératif que les cellules aérobies maintiennent une concentration optimale en ROS intracellulaires. Des différences dans les profils d'expression des enzymes anti-oxydantes observées dans les cerveaux de patients atteints de ces maladies suggèrent un rôle important de ces enzymes dans le processus de neurodégénération. Une étude immunohistochimique faite sur des cerveaux de souris a permis de mettre en évidence la présence de peroxiredoxine de type VI dans les noyaux des astrocytes et des oligodendrocytes. Les oligodendrocytes sont responsables de la formation de la gaine de myéline des fibres nerveuses dans le système nerveux central. Ils entourent aussi les corps cellulaires des nerfs et ont probablement une fonction similaire à celle des cellules satellites des ganglions sensoriels périphériques (Jin *et al.*, 2005). De plus, il apparaît que la Prx VI protège de la fragmentation de l'ADN médiée par les ROS, ce qui résulte en une mort neuronale par apoptose. Donc, une sur-expression de la Prx VI pourrait être liée à un plus haut degré de perte neuronale dans la maladie de Parkinson. Dans notre expérience, nous avons observé une sur-expression de cette protéine suite à une contamination à 1 ppb de PCBs. Ces polluants pourraient donc être également à l'origine de pertes neuronales, ce qui pourrait contribuer aux nombreux dommages observés chez des individus contaminés aux PCBs.

#### Protéines chaperonnes.

La maladie d'Alzheimer est également associée à un mauvais repliement de certaines protéines et à une diminution du renouvellement protéique (Butterfield *et al.*, 2003). Cela peut être lié à un problème de régulation des protéines chaperonnes. C'est le cas notamment de la heat shock protein cognate 70 (Hsc 70). Nous avons observé dans les résultats du microséquençage la présence de diverses protéines appartenant à la famille des heat shock proteins. C'est le cas notamment des Hsp 74, Hsc 70 et Hsp 27. La Hsp 74 est sur-exprimée de manière significative dans les conditions 1 ppb et 10 ppb de PCBs par rapport au contrôle DMSO. Concernant la Hsc 70 et l'Hsp 27, la première est sur-exprimée de manière hautement significative et la seconde est sous-exprimée de manière significative dans la condition 10 ppb de PCBs uniquement. Tout organisme est doté de mécanismes lui permettant de résister à des changements dans son environnement. Exposée à des modifications de température ou à une large variété de conditions toxiques qui vont de l'exposition aux métaux lourds à l'infection virale, la plupart des cellules activent l'expression de ce type de protéines. Les protéines de choc thermique sont divisées en 6 familles désignées par leur poids moléculaire (hsp 25, 40, 70, ...) et font partie des molécules chaperonnes qui s'associent à d'autres molécules (protéines ou ARNs) et en protègent la destinée. En tant que chaperons moléculaires, les Hsp sont impliquées dans de nombreux processus pathologiques qui s'accompagnent d'altérations des protéines comme les maladies chroniques et dégénératives (Wirth *et al.*, 2002). C'est le cas notamment de la maladie de Parkinson, d'Alzheimer ou encore de la sclérose amyotrophique latérale qui sont toutes les trois dues à des problèmes de conformation des protéines ou à la mort de certaines sous-populations neuronales. L'induction de ces protéines a d'abord été interprétée comme un signal pour la détection d'un stress, il semble maintenant établi qu'elles sont également utilisées par les cellules dans un processus de récupération (Feige *et al.*, 1996 cité dans Wirth *et al.*, 2002). Les heat shock proteins fournissent une ligne de défense contre un mauvais repliement et l'agrégation des protéines prédisposées.

La Hsc 70 est une protéine qui est localisée au niveau des synapses et qui possède des rôles spécifiques pas encore bien définis dans les processus d'apprentissage et de mémorisation. Récemment, Fukudo *et al.* (1999) démontrèrent qu'un stress psychophysiologique chez le rat induisait une augmentation de l'expression des ARNm codant pour les Hsc 70. Cette augmentation est souvent mise en relation avec la mort des neurones. Or, on sait que des destructions au niveau de ces cellules peuvent affecter les capacités d'apprentissage et de la mémoire (Yoo *et al.*, 2001). Concernant la Hsp 27, elle semble être impliquée dans la mise en place de la maladie d'Alzheimer causée notamment par des changements conformationnels dans les structures secondaire et tertiaire des protéines et des études récentes ont montré que plusieurs chaperons moléculaires étaient impliqués dans ce processus. L'étude menée par Yoo *et al.* (2001) a identifié et quantifié 9 protéines chaperonnes différentes dans 7 régions du cerveau d'adultes ayant la maladie d'Alzheimer. L'Hsp 27 est une protéine bien étudiée dans cette pathologie et son expression semble être le reflet d'une réponse de défense pour diminuer la formation de fibres amyloïdes et la toxicité qui s'ensuit. L'Hsp 27 est retrouvée souvent à des taux anormalement élevés chez des patients atteints de maladies neurodégénératives (Virot *et al.*, 2004). Les niveaux en Hsc 70 et Hsp 27 constitutivement exprimés dans les populations cellulaires neuronales sont corrélés avec les fréquences relatives des maladies neurodégénératives pré-citées (Chen et Brown, 2007). Il a été montré également que l'expression de l'Hsp 74 est altérée dans le système nerveux de mammifères mis en présence d'agents qui affecteraient la stabilité des microtubules. Une altération des niveaux d'expression des heat shock proteins pourrait donc être impliquée dans les déficits neurodéveloppementaux et neurocomportementaux observés chez les animaux soumis à une exposition aux PCBs.

#### Autres protéines.

La glyoxalase de type I est également une protéine dont les changements d'expression sont impliqués dans des maladies neurodégénératives (Amicarelli *et al.*, 1998). La glyoxalase I est sur-exprimée de manière significative au sein du système nerveux des têtards contaminés par une dose de 1 ppb d'Aroclor 1254. Son niveau d'expression est également augmenté dans le cerveau de personnes souffrant de la maladie d'Alzheimer (Kuhla *et al.*, 2007). La glyoxalase I joue un rôle critique dans la détoxification de composés dicarbonylés et ainsi réduit la formation de produits finaux de la glycation<sup>11</sup>. Les produits dicarbonylés sont généralement des intermédiaires toxiques du métabolisme qui induisent un stress oxydatif et pourraient être responsables de l'apoptose et de la vulnérabilité des cellules nerveuses (Kuhla *et al.*, 2007). Chen *et al.* (2004) ont montré chez des souris transgéniques mutantes ainsi que chez des personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer, que les niveaux protéiques de la glyoxalase I étaient significativement élevés dans le cerveau.

Par rapport à la métamorphose, il a été démontré que l'activité de la glyoxalase I est exprimée à des niveaux significatifs dès le début du développement, atteignant les valeurs les plus élevées à la fin de la métamorphose (Amicarelli *et al.*, 1998). Les embryons des amphibiens sont donc bien équipés pour se défendre durant toutes les phases de développement contre les effets délétères de métabolites toxiques provenant du métabolisme oxydatif.

Enfin, une association entre la maladie d'Alzheimer et la dihydrolipoamide S-succinyltransférase est souvent établie mais reste à ce jour controversée. Cette protéine est une enzyme mitochondriale qui est exprimée dans les neurones du cerveau (Takase *et al.*, 1996). Elle constitue une des trois sous-unités du complexe  $\alpha$ -kétoglutarate déshydrogénase.

<sup>11</sup> La glycation des protéines est une réaction entre un glucide et une protéine. Elle génère des protéines glyquées qui ne peuvent être ni détruites, ni libérées de la cellule dans laquelle elles s'accumulent. La glycation joue un rôle important dans la genèse de certaines maladies en provoquant des lésions cellulaires et tissulaires.

Des niveaux réduits de cette enzyme du cycle de Krebs pourraient contribuer aux mécanismes neurodégénératifs du cerveau chez les personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer (Mastrogiacoma *et al.*, 1996). Les résultats obtenus dans cette étude permettent de suggérer qu'une dysfonction mitochondriale fait partie du processus pathophysiologique dans la maladie d'Alzheimer. Dans notre étude, nous observons également une diminution significative de l'expression de cette protéine au sein du système nerveux suite à une exposition à 10 ppb de PCBs. Une telle diminution pourrait peut-être induire une chute des niveaux d'activité du complexe  $\alpha$ -kéto-glutarate déshydrogénase et ainsi augmenter la probabilité d'avoir des problèmes neurodégénératifs.

#### Protéine nucléaire maternelle.

Un problème important dans le domaine du développement chez les vertébrés est la compréhension du mécanisme responsable de l'établissement des axes dorso-ventral et antéro-postérieur durant l'embryogenèse (El-Hodiri *et al.*, 1997). Il est connu qu'immédiatement après la fécondation, la polarité dorso-ventrale est définie. Xnf 7 est un régulateur développemental qui est issu d'un gène maternel impliqué dans la détermination de l'axe dorso-ventral du mésoderme chez l'embryon en développement (Knöchel et Kaufmann, 1997). La protéine Xnf7 est conservée dans la vésicule germinale du noyau de l'oocyte sous une forme hypophosphorylée. Lors de la maturation de l'oocyte, il y a hyperphosphorylation ainsi que relargage de Xnf7 dans le cytoplasme, où il est ancré jusqu'à la moitié du stade blastula, après quoi il est déphosphorylé et entre dans le noyau (Miller *et al.*, 1991). Les transcrits de Xnf7 au stade neurula sont localisés dans la région dorsale de l'embryon, incluant les replis neuraux et les somites. Xnf7 n'est pas exprimé dans la partie ventrale des embryons (Gong *et al.*, 1995). Son mécanisme de fonctionnement n'est pas encore très clair (El-Hodiri *et al.*, 1997). Rappelons toutefois que dans notre expérience, nous avons travaillé sur des organismes en développement et non sur des embryons. Aucune information n'existe concernant la présence et les fonctions de ce facteur sur les stades post-embryonnaires.

#### Protéine impliquée dans le métabolisme énergétique.

A cause des demandes en énergie élevées et fluctuantes, le maintien de l'homéostasie énergétique dans le cerveau nécessite un couplage entre la production et la consommation d'énergie, notamment pour la performance sensorielle et la réalisation des tâches motrices, émotionnelles et cognitives. L'activité électrogène du  $\text{Ca}^{2+}$ , les  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPases, le cycle des neurotransmetteurs, la synthèse de molécules ... nécessitent tous de l'ATP. La réaction dans laquelle est impliquée la créatine kinase est importante pour le stockage et la distribution rapide des groupes phosphorylés hautement énergétiques (Streijger *et al.*, 2005). La créatine kinase de type B (brain) (BCK) est présente dans les neurones et les cellules gliales du cerveau. Ses niveaux sont plus élevés dans les astrocytes et les oligodendrocytes que dans les neurones. Une étude menée par Streijger et ses collaborateurs (2005) sur des souris déficientes en BCK a permis de démontrer l'importance de la BCK dans le fonctionnement normal du cerveau. Une déficience de cette enzyme produit un impact sévère sur l'hippocampe impliqué dans les processus d'apprentissage de l'espace notamment. En effet, les chercheurs ont observé chez ces souris une série d'anomalies comportementales comme par exemple une altération sévère de l'apprentissage de l'espace, une diminution importante de l'activité de la construction du nid et, une chute significative des réponses de réflexe notamment celle de la fuite en réponse à un stress. Dans cette étude, l'absence totale de BCK a créé une situation dans laquelle la neurotransmission est affectée.

De plus, il a été démontré que la protéine kinase de typ B est une protéine oxydée. Or, il apparaît qu'un des mécanismes possibles dans le processus de neurodégénération peut être généré sur base de certaines protéines oxydées. Plusieurs caractéristiques du cerveau malade comme l'accumulation d'agrégats et de protéines endommagées, des longueurs plus faibles des dendrites ... sont en accord avec des dysfonctionnements putatifs de certaines de ces protéines (Butterfield *et al.*, 2003). Comme mentionné précédemment, la créatine kinase est directement impliquée dans la production d'ATP ; si son activité enzymatique est diminuée dans le cerveau atteint de maladies neurodégénératives telle que la maladie d'Alzheimer, la production d'ATP sera compromise. Cela pourrait être dramatique spécialement pour les synapses, site probable de l'attaque des neurones dans la maladie d'Alzheimer (Mattson *et al.*, 2001 cité dans Butterfield *et al.*, 2003). Les pompes ioniques, les gradients électrochimiques, le potentiel cellulaire et d'autres aspects des neurones seront compromis par la diminution des niveaux d'ATP. La neurodégénération s'ensuit. Dans notre étude, nous observons une diminution significative de la créatine kinase du cerveau chez les têtards exposés à l'Aroclor 1254. Cela pourrait être le signe d'un problème de neurodégénération.

Concernant la régulation de l'expression des créatine kinases (CK) par les hormones thyroïdiennes, cela est encore fortement discuté (Wallimann et Hemmer, 1994). L'étude de Prakash *et al.* (2007) menée sur 30 patients hypothyroïdiens et 20 patients hyperthyroïdiens a permis de mettre en évidence une relation inverse entre l'activité de la créatine kinase sérique et celle de la T3. Environ 60 % des sujets hypothyroïdiens montraient une augmentation significative de l'activité de la créatine kinase. Par contre, l'hyperthyroïdisme induit quant à lui une diminution significative de son activité. Nous avons observé dans notre étude une diminution du niveau d'expression de la créatine kinase du cerveau ainsi qu'une augmentation des niveaux en hormones thyroïdiennes T3 et T4 pour le premier prélèvement avec l'augmentation de la dose de PCBs reçue. Un lien entre l'hyperthyroïdisme et l'augmentation de l'expression de la BCK pourrait donc être établi. Il existe très peu d'informations à propos des processus par lesquels les hormones thyroïdiennes affectent les niveaux en créatine kinase.

Pour conclure, nous pouvons constater qu'il est difficile de faire un lien entre les variations des niveaux en hormones thyroïdiennes et les protéines identifiées par spectrométrie de masse. Pour certaines, comme la créatine kinase du cerveau, des informations existent. Par contre pour les autres, aucun lien n'a été établi à ce jour. Il existe également très peu voire pas d'informations concernant le rôle de ces protéines dans le processus de métamorphose.

## Cinquième partie

# Conclusions et perspectives

## Conclusions et perspectives

Depuis un certain nombre d'années, la communauté scientifique a mis en évidence une augmentation du déclin des populations d'amphibiens partout dans le monde. Une des causes proposées actuellement est l'exposition prolongée de ces organismes à diverses substances toxiques dont, notamment, les xénobiotiques. Une altération de ce type n'occasionne pourtant que très peu d'effets directement visibles et spectaculaires. Cependant, de nombreuses études menées en laboratoire ont montré qu'une exposition aux polychlorobiphényles était en mesure de perturber la croissance, le développement et le comportement des organismes aquatiques en développement. Les amphibiens, et plus particulièrement les têtards en métamorphose, sont sensibles à la présence de polluants dans l'environnement et leur présence constitue un bon indicateur de la contamination du milieu aquatique. A l'exposition des amphibiens aux xénobiotiques comme une des causes du déclin mondial de leur population, s'ajoutent également d'autres facteurs comme la dégradation de l'habitat et du milieu aquatique par l'homme, les radiations UV, le réchauffement climatique... Il est donc important de resituer la problématique dans son contexte général et de tenir compte de tous ces changements dans les tentatives d'explication du déclin des populations.

La majorité des études existant à ce jour et dont l'objectif est d'étudier l'impact des PCBs sur le développement des amphibiens, se sont portées sur des contaminations aiguës de larves ou de têtards d'espèces modèles parmi lesquelles on retrouve le xénope et la grenouille rousse. Il a été montré dans ces travaux qu'une exposition aux PCBs induit entre autres des modifications de la morphologie, du poids, de la taille et du contenu en diverses hormones dont les hormones thyroïdiennes. Cependant, les organismes dans leur milieu naturel sont soumis à des doses de polluants souvent nettement plus faibles et à des durées d'exposition beaucoup plus longues. Notre étude est donc originale et intéressante dans ce sens puisque les doses utilisées sont très faibles, à savoir 0,1 ; 1 et 10 ppb d'Aroclor 1254 et la durée d'exposition relativement longue. En effet, les têtards de xénopes sont soumis à ce polluant depuis le 12<sup>ème</sup> jour jusqu'au 54<sup>ème</sup> jour PF, ce qui n'a encore jamais été réalisé auparavant dans cette thématique. Il n'a donc pas été surprenant d'observer des résultats allant à l'encontre de tout ce qui avait été mis en évidence dans les travaux précédents. En effet, nous observons par exemple une augmentation des concentrations en hormones thyroïdiennes T3 et T4 ainsi que du poids des têtards au premier prélèvement, faits opposés à tout ce qui a été décrit précédemment. Cependant, dans notre étude, le dosage des hormones thyroïdiennes T3 et T4 dans différents organes n'était qu'une approche préliminaire. Il serait donc utile, étant donné les profils obtenus et le rôle de ces hormones dans la mise en place du système nerveux central ainsi que dans le contrôle de l'expression des gènes, d'approfondir cette analyse afin de confirmer les observations réalisées. Il pourrait également être intéressant d'effectuer un dosage des déiodinases dans ces différents organes afin de pouvoir déterminer le mécanisme d'action des PCBs. Concernant le poids, une différence significative a été mise en évidence entre les têtards de la condition 10 ppb par rapport à ceux de la condition 0,1 ppb et du contrôle DMSO. Il existe donc un effet du traitement sur le poids des têtards lors de ce prélèvement uniquement.

Il a été démontré par de nombreuses études qu'une contamination d'embryons ou d'organismes en développement par les PCBs induit de nombreux dommages au niveau neurologique. Les résultats mis en évidence par l'analyse protéomique et la spectrométrie de masse réalisées sur le cerveau de têtards contaminés à des doses de 1 et 10 ppb d'Aroclor 1254 nous montrent la présence de modifications des niveaux d'expression d'un grand nombre de protéines qui sont également impliquées dans des pathologies telles que la maladie

d'Alzheimer ou encore la maladie de Parkinson. C'est le cas notamment de la peroxiredoxine de type VI, des Hsp 27, 70 et 74, de la glyoxalase de type I et de la dihydrolipoamide S-succinyltransférase. L'étiologie de ces maladies neurodégénératives a été partiellement attribuée à des traits acquis au cours de la vie de l'individu. Cependant, on pourrait se demander dans quelle mesure leur incidence ne pourrait pas être augmentée dans un avenir proche, en réponse à la contamination du milieu environnemental par les PCBs. Des facteurs environnementaux pourraient donc éventuellement contribuer à l'apparition de telles maladies. Il serait également intéressant de pouvoir mettre en relation les variations des concentrations en hormones thyroïdiennes avec les changements dans les niveaux d'expression de ces protéines. Cela pourrait peut-être fournir des pistes quant aux rôles et mécanismes d'action des PCBs dans une éventuelle apparition de maladies neurodégénératives.

L'étude du protéome, ou ensemble des protéines exprimées par un acteur biologique à un moment donné et sous des conditions spécifiques, constitue une étape supplémentaire pour la compréhension des mécanismes d'action des PCBs. Rappelons toutefois que ce n'est que depuis quelques années que l'approche protéomique s'est fortement développée dans les laboratoires de biologie moléculaire et que les avancées techniques importantes de ces dernières années ont rendu de telles études de plus en plus reproductibles et ainsi comparables entre laboratoires. En écotoxicologie, cette technique a permis de démontrer que, même si la physiologie d'un organisme semble être intacte, un environnement stressant peut induire une réponse biologique au niveau du protéome. Cela pourrait être le cas pour la condition 0,1 ppb de PCBs dont l'analyse protéomique n'a pas été réalisée en raison de faibles variations des niveaux des THs et d'un nombre peu élevé d'individus malformés. Par ces analyses protéomiques, un certain nombre de biomarqueurs pourront être définis et constituer un « système d'alarme » qui doit être pris en compte pour évaluer si une modification environnementale telle que la présence d'un polluant particulier dans l'environnement est acceptable en vue d'éviter des répercussions sur l'évolution des organismes. La technique du 2D-DIGE comporte de nombreux avantages et est porteuse de succès dans le domaine de l'écotoxicologie aquatique.

L'analyse protéomique réalisée dans cette étude s'est portée sur des têtards arrivés au stade 54/55 de la métamorphose. Il pourrait être utile d'effectuer de telles analyses sur des stades de développement antérieurs et postérieurs à celui-ci afin de déterminer d'une part à partir de quelle durée d'exposition les protéines impliquées dans les maladies neurodégénératives commencent à subir l'effet des PCBs. D'autre part, une étude du protéome sur des stades ultérieurs, notamment après le climax métamorphique, pourrait peut-être nous montrer d'autres variations de protéines et confirmer (ou infirmer) ce qui a été observé au stade 54/55. Au vu des résultats obtenus en spectrométrie de masse, une confirmation d'un grand nombre de spots est nécessaire. En effet, il n'est pas normal qu'un spot soit caractérisé par la présence de plusieurs protéines ayant des séquences peptidiques totalement divergentes. Une restriction de la gamme de pH utilisée sera nécessaire afin d'augmenter encore la résolution des gels en vue d'une meilleure séparation des différents spots. Une approche par Western-Blot confirmera ensuite l'identification des protéines. Une approche par la génomique pourrait être effectuée en vue d'établir un lien entre l'expression des gènes et des protéines codées par ces gènes. Cela permettrait également de mieux comprendre les mécanismes d'action des PCBs au niveau des gènes et des protéines.

Enfin, les résultats des analyses de PCBs ont montré la présence de concentrations non négligeables de ces polluants dans les aliments de la firme Sera. Cela nous amène à nous poser des questions quant à la contamination actuelle de notre environnement par les xénobiotiques, dont les PCBs.



# Bibliographie

## Bibliographie

- Ahlborg, U. G., Becking, G. C., Birnbaum, L. S., Brouwer, A., Derks, H. J. G. M., Feeley, M., Golor, G., Hanberg, A., Larsen, J. C., Liem A. K. D., Safe, S. H., Schlatter, C., Waern, F., Younes, F. & Yrjanheikki, E. Toxic equivalency factors for dioxin-like PCBs. *Chemosphere* **28**, 1049-1067 (1994).
- Alvarez, R., Honrubia, M. P. & Herráez, M. P. Skeletal malformations induced by the insecticides ZZ-Aphox® and Folidol® during larval development of *Rana perezi*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **28**, 349-356 (1995).
- Amicarelli, F., Sacchetta, P., Colafarina, S., Angelucci, S., Miranda, M. & Di Ilio, C. Glyoxalases activity during *Bufo bufo* embryo development. *Mechanisms of Ageing and Development* **100**, 261-267 (1998).
- Apraiz, I., Mi, J. & Cristobal, S. Identification of proteomic signatures of exposure to marine pollutants in mussels (*Mytilus edulis*). *Mol. Cell. Proteomics* **5** (7), 1274-1285 (2006).
- Bandara, L. R. & Kennedy, S. Toxicoproteomics - a new preclinical tool. *DDT* **7** (7), 411-418 (2002).
- Barrier, M. & Mirkes, P. E. Proteomics in developmental toxicology. *Reproductive toxicology* **19**, 291-304 (2005).
- Beck, V., Roelens, S. A. & Darras, V. M. Exposure to PCB 77 induces tissue-dependent changes in iodothyronine deiodinase activity patterns in the embryonic chicken. *General and Comparative Endocrinology* **148**, 327-335 (2006).
- Becker, K. B., Stephens, K. C., Davey, J. C., Schneider, M. J. & Galton, V. A. The type 2 and type 3 iodothyronine deiodinases play important roles in coordinating development in *Rana catesbeiana* tadpoles. *Endocrinology* **138** (7), 2989-2993 (1997).
- Berry, D. L., Rose, C. S., Remo, B. F. & Brown, D. D. The Expression Pattern of Thyroid Hormone Response Genes in Remodeling Tadpole Tissues Defines Distinct Growth and Resorption Gene Expression Programs. *Developmental Biology* **203**, 24-35 (1998).
- Bertrand, S. & Laudet, V. La métamorphose des amphibiens : un modèle prometteur pour étudier les protéases de la matrice. *Médecine/Sciences* **17**, 1195-1200 (2001).
- Brown, D. D. & Cai, L. Amphibian metamorphosis. *Developmental Biology*, 1-14 (2007).
- Bucheli, T. D. & Fent, K. Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* **25**, 201-268 (1995).
- Buchholz, D. R., Paul, B. D., Fu, L. & Shi Y. B. Molecular and developmental analyses of thyroid hormone receptor function in *Xenopus laevis*, the African clawed frog. *General and Comparative Endocrinology* **145**, 1-19 (2006).
- Burgin, D. E., Diliberto, J. J., Derr-Yellin, E. C., Kannan, N., Kodavanti, P. R. S. & Birnbaum, L. S. Differential effects of two lots of Aroclor 1254 on enzyme induction, thyroid hormones and oxidative stress. *Environmental Health Perspectives* **109** (11), 1163-1168 (2001).
- Burreau, S., Broman, D. & Orn, U. Tissue distribution of 2,2',4,4'-tetrabromo[14C]diphenyl ether ([14C]-PBDE 47) in pike (*Esox lucius*) after dietary exposure--a time series study using whole body autoradiography. *Chemosphere* **40** (9-11), 977-985 (2000).

- Butterfield, D. A., Boyd-Kimball, D. & Castegna, A. Proteomics in Alzheimer's disease : insights into potential mechanisms of neurodegeneration. *Journal of Neurochemistry* **86**, 1313-1327 (2003).
- Byrne, J. J., Carbone, J. P. & Hanson, E. A. Hypothyroidism and abnormalities in the kinetics of thyroid hormone metabolism in rats treated chronically with polychlorinated biphenyl and polybrominated biphenyl. *Endocrinology* **121** (2), 520-527 (1987).
- Cai, L. & Brown, D. D. Expression of type II iodothyronine deiodinase marks the time that a tissue responds to thyroid hormone-induced metamorphosis in *Xenopus laevis*. *Developmental Biology* **266**, 87-95 (2004).
- Carlsson, G., Kulkarni, P., Larsson, P. & Norrgren, L. Distribution of BDE-99 and effects on metamorphosis of BDE-99 and -47 after oral exposure in *Xenopus tropicalis*. *Aquat. Toxicol.* **84** (1), 71-79 (2007).
- Chen, F., Wollmer, M. A., Hoernkli, F., Münch, G., Kuhla, B., Rogaev, E., Tsolaki, M., Papassotiropoulos, A. & Götz, J. Role for glyoxalase I in Alzheimer's disease. *PNAS* **101** (20), 7687-7692 (2004).
- Chen, S. & Brown, I. R. Neuronal expression of constitutive heat shock proteins : implications for neurodegenerative diseases. *Cell. Stress Chaperones* **12** (1), 51-58 (2007).
- Cohen Jr, M. M. Frog Decline, Frog Malformation and a Comparison of Frog and Human Health. *American Journal of Medical Genetics* **104**, 101-109 (2001).
- Coletti, D., Palleschi, S., Silvestroni, L., Cannavo, A. & Vivarelli, E. Polychlorobiphenyls inhibit skeletal muscle differentiation in culture. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **175**, 226-233 (2001).
- Cravedi, J-P & Narbonne, J-F. Données récentes sur l'évaluation des dangers liés à la présence de PCBs dans l'alimentation. *Agence française de sécurité sanitaire des aliments*, 1-52 (2002).
- Das, B., Cai, L., Carter, M. G. , Piao, Y. L., Sharov, A. A., Ko, M. S. H. & Brown, D. D. Gene expression changes at metamorphosis induced by thyroid hormone in *Xenopus laevis* tadpoles. *Developmental Biology* **291**, 342-355 (2006).
- Debier, C., Pomeroy, P. P., Dupont, C., Joiris, C., Comblin, V., Le Boulengé, E., Larondelle, Y. & Thomé, J-P. Dynamics of PCB transfer from mother to pup during lactation in UK grey seals *Halichoerus grypus* : differences in PCB profile between compartments of transfer and changes during the lactation period. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **247**, 249-256 (2003).
- Delaune, E., Lemaire, P. & Kodjabachian, L. Neural induction in *Xenopus* requires early FGF-signalling in addition to BMP inhibition. *Development* **132** (2), 299-310 (2005).
- Denver, R. J. The molecular basis of thyroid hormone-dependent central nervous system remodeling during amphibian metamorphosis. *Comparative Biochemistry and Physiology* **119**, 219-228 (1998).
- Denver, R. J. , Pavgi, S. & Shi, Y. B. Thyroid Hormone-dependent Gene Expression Program for *Xenopus* Neural Development. *The Journal of Biological Chemistry* **272** (13), 8179-8188. (1997).
- Dongré, A. R., Eng, J. K. & Yates, J. R. Spectrométrie de masse en tandem. *Biofutur* **181** (106), 1-11 (1998).
- El-Hodiri, H. M., Shou, W. & Etkin, L. D. xnf7 functions in dorsal-ventral patterning of the *Xenopus* embryo. *Developmental Biology* **190**, 1-17 (1997).

- Fisher, M. A., Jelaso, A. M., Predenkiewicz, A., Schuster, L., Means, J. & Ide, C. F. Exposure to the polychlorinated biphenyl mixture Aroclor 1254 alters melanocyte and tail muscle morphology in developing *Xenopus laevis* tadpoles. *Environ. Toxicol. Chem.* **22** (2), 321-328 (2003).
- Fisher, J. W., Campbell, J., Muralidhara, S., Bruckner, J. V., Ferguson, D., Mumtaz, M., Harmon, B., Hedge, J. M., Crofton, K. M., Kim, H. & Almekinder, T. L. Effect of PCB 126 on hepatic metabolism of thyroxine and perturbations in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis in the rat. *Toxicological Sciences* **90** (1), 87-95 (2006).
- Fukudo, S., Abe, K., Itoyama, Y., Mochizuki, S., Sawai, T. & Hongo, M. Psychophysiological stress induces heat shock cognate protein 70 messenger RNA in the hippocampus of rats. *Neuroscience* **91** (4), 1205-1208 (1999).
- Gardiner, D. M. & Hoppe, D. M. Environmentally induced limb malformations in mink frogs (*Rana septentrionalis*). *J. Exp. Zool.* **284**, 207-216 (1999).
- Gauthier, K., Chassande, O., Plateroti, M., Roux, J. P., Legrand, C., Pain, B., Rousset, B., Weiss, R., Trouillas, J. & Samarut, J. Different functions for the thyroid hormone receptors TR $\alpha$  and TR $\beta$  in the control of thyroid hormone production and post-natal development. *The EMBO Journal* **18** (3), 623-631 (1999).
- Giesy, J. P. & Kannan, K. Dioxin-like and non-dioxin like effects of polychlorinated biphenyls: Implications for risk assessment. *Lakes & Reservoirs : Research and Management* **7**, 139-181 (2002).
- Gillardin, V., Silvestre, F., Dieu, M., Delaive, E., Raes, M. & Kestemont, P. Acute and chronic exposure to Aroclor 1254 impair protein expression profiles in *Xenopus laevis* tadpoles during early development and metamorphosis. SETAC Europe 17<sup>th</sup> Annual Meeting, Portugal (2007).
- Gillardin, V., Silvestre, F., Divoy, C., Thomé, J. P. & Kestemont, P. Effects of Aroclor 1254 on oxidative stress in developing *Xenopus laevis* tadpoles. Soumis à *Ecotoxicology and Environmental Safety* (2007).
- Gilliland, C. D., Summer, C. L., Gilliland, M. G., Kannan, K., Villeneuve, D. L., Kemler Coady, K., Muzzall, P., Mehne, C. & Giesy, J. P. Organochlorine insecticides, polychlorinated biphenyls, and metals in water, sediment, and green frogs from southwestern Michigan. *Chemosphere* **44**, 327-339 (2001).
- Glennemeier, K. A. & Begnoche, L. J. Impact of organochlorine contamination on amphibian populations in Southwestern Michigan. *Journal of Herpetology* **36** (2), 233-244 (2002).
- Glennemeier, K. A. & Denver, R. J. Sublethal effects of chronic exposure to an organochlorine compound on Northern Leopard frog (*Rana pipiens*) tadpoles. *Environment toxicol.* **16** (4), 287-297 (2001).
- Gong, S. G., Reddy, B. A. & Etkin, L. D. Two forms of *Xenopus* nuclear factor 7 have overlapping spatial but different temporal patterns of expression during development. *Mech. Dev.* **52** (2-3), 305-318 (1995).
- Grandjean, P. & Landrigan, P. J. Developmental neurotoxicity of industrial chemicals. *www.thelancet.com* **368**, 2167-2178 (2006).
- Graves, P. R. & Haystead, A. J. Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **66**, 39-63 (2002).

- Guadaño-Ferraz, A., Escámez, M. J., Rausell, E. & Bernal, J. Expression of type 2 iodothyronine deiodinase in hypothyroid rat brain indicates an important role of thyroid hormone in the development of specific primary sensory systems. *The journal of Neuroscience* **19** (9), 3430-3439 (1999).
- Guéguen, Y., Mouzat, K., Ferrari, L., Tissandie, E., Lobaccaro, J. M. A., Batt, A. M., Paquet, F., Voisin, P., Aigueperse, J., Gourmelon, P. & Souidi, M. Les cytochromes P450 : métabolisme des xénobiotiques, régulation et rôle en clinique. *Ann. Biol. Clin.* **64** (6), 535-548 (2006).
- Guiney, P., Smolowitz, R., Peterson, R. & Stegeman, J. Correlation of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin induction of cytochrome p4501a in vascular endothelium with toxicity in early life stages of lake trout. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **143**, 256-273 (1997).
- Gutleb, A. C., Appelman, J., Bronkhorst, M. C., van den Berg, J. H. J., Spenkelink, A., Brouwer, A. & Murk, A. J. Delayed effects of pre- and early-life time exposure to polychlorinated biphenyls on tadpoles of two amphibian species (*Xenopus laevis* and *Rana temporaria*). *Environmental Toxicology and Pharmacology* **8**, 1-14 (1999).
- Gutleb, A. C., Appelman, J., Bronkhorst, M., van den Berg, J. H. J. & Murk, A. J. Effects of oral exposure to polychlorinated biphenyls (PCBs) on the development and metamorphosis of two amphibian species (*Xenopus laevis* and *Rana temporaria*). *The Science of the Total Environment* **262**, 147-157 (2000).
- Hahn, M. E. The aryl hydrocarbon receptor : a comparative perspective. *Comparative Biochemistry and physiology* **121**, 23-53 (1998).
- Hahn, M. E. Aryl hydrocarbon receptors : diversity and evolution. *Chemico-Biological Interactions* **141**, 131-160 (2002).
- Hanken, J. & Hall, B. K. Skull development during anuran metamorphosis, role of thyroid hormone in osteogenesis. *Anat. Embryol* **178**, 219-227 (1988).
- Harland, R. & Gerhart, J. Formation and function of Spemann's organizer. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol* **13**, 611-667 (1997).
- Harper, P. A., Riddick, D. S. & Okey, A. B. Regulating the regulator : Factors that control levels and activity of the aryl hydrocarbon receptor. *Biochemical Pharmacology* **72**, 267-279 (2006).
- Hauser, P., McMillin, J. M. & Bhatara, V. S. Resistance to thyroid hormone: implications for neurodevelopmental research on the effects of thyroid hormone disruptors. *Toxicology and Industrial Health* **14** (1-2), 85-101 (1998).
- Heijne, W. H. M., Kienhuis, A. S., van Ommen, B., Stierum, R. H. & Groten, J. P. Systems toxicology : applications of toxicogenomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics in toxicology. *Expert Rev. Proteomics* **2** (5), 767-780 (2005).
- Helbing, C. C., Ovaska, K. & Ji, L. Evaluation of the effect of acetochlor on thyroid hormone receptor gene expression in the brain and behavior of *Rana castebeiana* tadpoles. *Aquatic Toxicology* **80**, 42-51 (2006).
- Hemmati-Brivanlou, A. La morphogenèse du système nerveux chez les vertébrés. *Médecine/Sciences* **16**, 150-158 (2000).
- Henry, T.R., Spitsbergen, J. M., Hornung, M. W., Abnet, C. C. & Peterson, R. E. Early life stages toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **142**, 56-68 (1997).

- Hogan, N. S., Crump, K. L., Duarte, P., Lean, D. R. S., Trudeau, V. L. Hormone cross-regulation in the tadpole brain : developmental expression profiles and effect of T3 exposure on thyroid hormone- and oestrogen-responsive genes in *Rana pipiens*. *General and Comparative Endocrinology*, 1-41 (2007).
- Huang, H., Cai, L., Remo, B. F. & Brown, D. D. Timing of metamorphosis and the onset of the negative feedback loop between the thyroid gland and the pituitary is controlled by type II iodothyronine deiodinase in *Xenopus laevis*. *PNAS* **98** (13), 7348-7353 (2001).
- Huisman, M., Koopman-Esseboom, C., Fidler, V., Hadders-Algra, M., van der Paauw, C. G., Tuinstra, L. G. M. Th., Weisglas-Kuperus, N., Sauer, P. J. J., Touwen, B. C. L., Boersma, E. R. Perinatal exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins and its effects on neonatal neurological development. *Early Human Development* **41**, 111-127 (1995).
- Hulbert, A. J. Thyroid hormones and their effects : a new perspective. *Biol. Rev.* **75**, 519-631 (2000).
- Iwasaki, T., Miyazaki, W., Takeshita, A., Kuroda, Y. & Koibuchi, N. Polychlorinated biphenyls suppress thyroid hormone-induced transactivation. *Biochemical and Physiological Research Communications* **299**, 384-388 (2002).
- Jacobson, S. W., Fein, G. G., Jacobson, J. L., Schwartz, P. M. & Dowler, J. K. The effect of intrauterine PCB exposure on visual recognition memory. *Child Dev.* **56** (4), 853-860 (1985).
- Jacobson, J. L. & Jacobson, S. W. Intellectual impairment in children exposed to polychlorinated biphenyls in utero. *N. Engl. J. Med.* **335** (11), 783-789 (1996).
- Jacobson, J. L., Jacobson, S. W. & Humphrey, H. E. Effects of exposure to PCBs and related compounds on growth and activity in children. *Neurotoxicol. Teratol.* **12** (4), 319-326 (1990).
- Jelaso, A. M., DeLong, C., Means, J. & Ide, C. F. Dietary exposure to Aroclor 1254 alters gene expression in *Xenopus laevis* frogs. *Environmental Research* **98**, 64-72 (2005).
- Jelaso, A. M., Lehigh-Shirey, E., Means, J. & Ide, C. F. Gene expression patterns predict exposure to PCBs in developing *Xenopus laevis* tadpoles. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **42** (1), 1-10 (2003).
- Jelaso, A. M., Lehigh-Shirey, E., Predenkiewicz, A., Means, J. & Ide, C. F. Aroclor 1254 alters morphology, survival, and gene expression in *Xenopus laevis* tadpoles. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **40**, 24-35 (2002).
- Jelaso, A. M., DeLong, C., Means, J. & Ide, C. F. Dietary exposure to Aroclor 1254 alters gene expression in *Xenopus laevis* frogs. *Environmental Research* **98**, 64-72 (2005).
- Jin, M-H., Lee, Y-H., Kim, J-M, Sun, H-N, Moon, E-Y, Shong, M. H., Kim, S-U, Lee, S. H., Lee, T-H, Yu, D-Y & Lee, D-S. Characterization of neural cell types expressing peroxiredoxins in mouse brain. *Neuroscience Letters* **381**, 252-257 (2005).
- Jung, R. E. & Jagoe, C. H. Effects of low pH and aluminium on body size, swimming performance, and susceptibility to predation of green tree frog (*Hyla cinerea*) tadpoles. *Can. J. Zool.* **73**, 2171-2183 (1995).
- Kawajiri, K. & Fujii-Kuriyama, Y. Cytochrome P450 gene regulation and physiological functions mediated by the aryl hydrocarbon receptor. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1-6 (2007).
- Kimura-Kuroda, J., Nagata, I. & Kuroda, Y. Disrupting effects of hydroxy-polychlorinated biphenyl (PCB) congeners on neuronal development of cerebellar Purkinje cells : A possible causal factor for developmental brain disorders? *Chemosphere*, 1-9 (2007).

- Knöchel, W. et Kaufmann, E. Transcription factors and induction in *Xenopus laevis* embryos. *Cell. Mol. Life Sci.* **53**, 362-381 (1997).
- Köhrle, J. Local activation and inactivation of thyroid hormones : the deiodinase family. *Molecular and Cellular Endocrinology* **151**, 103-119 (1999).
- Koibuchi, N. & Chin, W. W. Thyroid hormone action and brain development. *TEM* **11** (4), 123-128 (2000).
- Koibuchi, N. & Iwasaki, T. Regulation of brain development by thyroid hormone and its modulation by environmental chemicals. *Endocrine Journal* **53** (3), 295-303 (2006).
- Krain, L. P. & Denver, R. J. Developmental expression and hormonal regulation of glucocorticoid and thyroid hormone receptors during metamorphosis in *Xenopus laevis*. *Journal of Endocrinology* **181**, 91-104 (2004).
- Krapfenbauer, K., Engidawork, E., Cairns, N., Fountoulakis, M. & Lubec, G. Aberrant expression of peroxiredoxin subtypes in neurodegenerative disorders. *Brain Research* **967**, 152-160 (2003).
- Kuhla, B., Boeck, K., Schmidt, A., Ogunlade, V., Arendt, T., Münch, G. & Lüth, H. J. Age- and stage-dependent glyoxalase I expression and its activity in normal and Alzheimer's disease brain. *Neurobiology of Aging* **28**, 29-41 (2007).
- Kuhla, B., Lüth, H. J., Haferburg, D., Weick, M., Reichenbach, A., Arendt, T. & Münch, G. Pathological effects of glyoxalase I inhibition in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Journal of Neuroscience Ressources* **83** (8), 1591-1600 (2006).
- Leguen, I., Carlsson, C., Perdu-Durand, E., Prunet, P., Pärt, P. & Cravedi, J. P. Xenobiotic and steroid biotransformation activities in rainbow trout gill epithelial cells in culture. *Aquatic Toxicology* **48**, 165-176 (2000).
- Lehigh Shirey, E. A., Jelaso Langerveld, A., Mihalko, D., Ide, C. F. Polychlorinated biphenyl exposure delays metamorphosis and alters thyroid hormone system gene expression in developing *Xenopus laevis*. *Environmental Research* **102**, 205-214 (2006).
- Loganathan, B. G. & Kannan, K. Global organochlorine contamination trends : an overview. *Ambio* **23**, 187-191 (1994).
- Malkiewicz, K., Mohammed, R., Folkesson, R., Winblad, B., Szutowski, M. & Benedikz, E. Polychlorinated biphenyls alter expression of alpha-synuclein, synaptophysin and parkin in the rat brain. *Toxicol. Lett.* **161** (2), 152-158 (2006).
- Manzon, R. G. & Denver, R. J. Regulation of pituitary thyrotropin gene expression during *Xenopus* metamorphosis : negative feedback is functional throughout metamorphosis. *J. Endocrinol.* **182** (2), 273-285 (2004).
- Marsh-Armstrong, N., Cai, L. & Brown, D. D. Thyroid hormone controls the development of connections between the spinal cord and limbs during *Xenopus laevis* metamorphosis. *PNAS* **101**, 165-170 (2004).
- Mastrogiacoma, F., Lindsay, J. G., Bettendorff, L., Rice, J. & Kish, S. J. Brain protein and alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex activity in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* **39** (5), 592-598 (1996).
- Matsumoto, A. & Ishii, S. Atlas of endocrine organs : vertebrates and invertebrates. Springer-Verlag, United States of America, 307 p. (1992).

- Miller, M., Reddy, B. A., Kloc, M., Li, X. X., Dreyer, C. & Etkin, L. D. The nuclear-cytoplasmic distribution of the *Xenopus* nuclear factor, xnf 7, coincides with its state of phosphorylation during early development. *Development* **113**, 569-575 (1991).
- Mima, S., Sakamoto, M. & Tanimura, T. Developmental toxicity induced in *Xenopus laevis* embryos by TCDD and its related compounds. *Teratology* **46**, 1819-1831 (1992).
- Nakajima, K., Fujimoto, K. & Yaoita, Y. Programmed cell death during amphibian metamorphosis. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **16**, 271-280 (2005).
- Nakajima, S., Saijo, Y., Kato, S., Sasaki, S., Uno, A., Kanagami, N., Hirakawa, H., Hori, T., Tobiishi, K., Todaka, T., Nakamura, Y., Yanagiya, S., Sengoku, Y., Lida, T., Sata, F. & Kishi, R. Effects of prenatal exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins on mental and motor development in Japanese children at 6 months of age. *Environmental Health Perspectives*, **114** (5), 773-778 (2006).
- Okey, A. B., Franc, M. A., Moffat, I. D., Tijet, N., Boutros, P. C., Korkalainen, M., Tuomisto, J. & Pohjanvirta, R. Toxicological implications of polymorphisms in receptors for xenobiotic chemicals : The case of the aryl hydrocarbon receptor. *Toxicology and Applied Pharmacology* **207**, S43-S51 (2005).
- Patandin, S., Dagnelie, P. C., Mulder, P. G. H., Op de Coul, E., van der Veen, J. E., Weisglas-Kuperus, N. & Sauer, P. J. J. Dietary exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins from infancy until adulthood : A comparison between breast-feeding, toddler and long-term exposure. *Environmental Health Perspectives* **107** (1), 45-51 (1999).
- Porterfield, S. P. Thyroidal dysfunction and environmental chemicals : potential impact on brain development. *Environmental Health Perspectives* **108**, 433-438 (2000).
- Porterfield, S. P. & Hendry, L. B. Impact of PCBs on thyroid hormone directed brain development. *Toxicology and industrial health* **14** (1-2), 103-120 (1998).
- Powell, D. C., Aulerich, R. J., Stromborg, K. L. & Bursian, S. J. Effects of 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl, 2,3,3',4,4'-pentachlorobiphenyl, and 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl on the developing chicken embryo when injected prior to incubation. *J. Toxicol. Environ. Health* **49**, 319-338 (1996).
- Prakash, A., Lal, A. K. & Negi, K. S. Serum creatine kinase activity in thyroid disorders. *JK Science* **9** (1), 25-26 (2007).
- Prapunpoj, P., Yamauchi, K., Nishiyama, N., Richardson, S. J. & Schreiber, G. Evolution of structure, ontogeny of gene expression, and function of *Xenopus laevis* transthyretin. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* **279**, 2026-2041 (2000).
- Promé, J. C. Spectrométrie de masse. *Biofutur* **89** (164), 1-12 (1997).
- Puga, A., Tomlinson, C.R. & Xia, Y. Ah receptor signals cross-talk with multiple developmental pathways. *Biochemical Pharmacology* **69**, 199-207 (2005).
- Reeder, A. L., Ruiz, M. O., Pessier, A., Brown, L. E., Levengood, J. M., Phillips, C. A., Wheeler, M. B., Warner, R. E. & Beasley, V. R. Intersexuality and the Cricket Frog Decline : Historic and Geographic Trends. *Environmental Health Perspectives* **113** (3), 261-265 (2005).
- Regard, E., Taurog, A. & Nakashima, T. Plasma thyroxine and triiodothyronine levels in spontaneously metamorphosing *Rana castelbeiana* tadpoles and in adult anuran amphibia. *Endocrinology* **102** (3), 674-684 (1978).



- Reyns, G. E., Janssens, K. A., Buyse, J., Kühn, E. R. & Darras, V. M. Changes in thyroid hormone levels in chicken liver during fasting and refeeding. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* **132** (1), 239-245 (2002).
- Roelens, S. A., Beck, V., Aerts, G., Clerens, S., Vanden Bergh, G., Arckens, L., Darras, V. M. & Van der Geyten, S. Neurotoxicity of polychlorinated biphenyls (PCBs) by disturbance of thyroid hormone-regulated genes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1040**, 454-456 (2005).
- Rogan, W. J. & Gladen, B. C. Neurotoxicology of PCBs and related compounds. *Neurotoxicology* **13** (1), 27-35 (1992).
- Ross, G. The public health implications of polychlorinated biphenyls (PCBs) in the environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **59**, 275-291 (2004).
- Rychen, G., Ducoulombier-Crépineau, C., Grova, N., Jurjanz, S. & Feidt, C. Modalités et risques de transfert des polluants organiques persistants vers le lait. *INRA Prod. Anim.* **18** (5), 355-366 (2005).
- Sachs, L. M., Damjanovski, S., Jones, P. L., Li, Q., Amano, T., Ueda, S., Shi, Y. B. & Ishizuya-Oka, A. Dual functions of thyroid hormone receptors during *Xenopus* development. *Comparative Biochemistry and Physiology* **126**, 199-211 (2000).
- Safe, S. H. Polychlorinated biphenyls (PCBs) : Environmental impact, biochemical and toxic responses and implications for risk assessment. *Critical Revieww Toxicology* **21**, 87-149 (1994).
- Savage, W. K., Quimby, F. W. & DeCaprio, A. P. Lethal and sublethal effects of polychlorinated biphenyls on *Rana sylvatica* tadpoles. *Environmental Toxicology and Chemistry* **21** (1), 168-174 (2002).
- Schäferling, M. & Nagl, S. Optical technologies for the read out and quality control of DNA and protein microarrays. *Anal. Bioanal. Chem.* **385**, 500-517 (2006).
- Schantz, S. L., Gasior, D. M., Polverejan, E., McCaffrey, R. J., Sweeney, A. M., Humphrey, H. E. & Gardiner, J. C. Impairments of memory and learning in older adults exposed to polychlorinated biphenyls via consumption of Great Lakes fish. *Environ. Health Perspect.* **109** (6), 605-611 (2001).
- Shepard, J. L., Olsson, B., Tedengren, M. & Bradley, B. P. Protein expression signatures identified in *Mytilus edulis* exposed to PCBs, copper and salinity stress. *Mar. Environ. Res.* **50** (1-5), 337-340 (2000).
- Shevchenko, A., Sunyaev, S., Loboda, A., Bork, P., Ens, W., Standing, K. G. Charting the proteomes of organisms with unsequenced genomes by MALDI-quadrupole time-of-flight mass spectrometry and BLAST homology searching. *Anal. Chem.* **73** (9), 1917-1926 (2001).
- Shi, Y-B. Amphibian metamorphosis : from morphology to molecular biology. Wiley-Liss, United States of America, 288p. (2000).
- Shrader, E. A., Henry, T. R., Greeley, M. S. & Bradley, B. P. Proteomics in Zebrafish exposed to endocrine disrupting chemicals. *Ecotoxicology* **12**, 485-488 (2003).
- Silvestre, F., Dierick, J. F., Dumont, V., Dieu, M., Raes, M. & Devos, P. Differential protein expression profiles in anterior gills of *Eriocheir sinensis* during acclimation to cadmium. *Aquatic Toxicology* **76**, 46-58 (2006).
- Simon, T., Britt, J. K. & James, R. C. Development of a neurotoxic equivalence scheme of relative potency for assessing the risk of PCB mixtures. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 1-15 (2007).

- Snappe, J. R., Maund, S. J., Pickford, D. B. & Hutchinson, T. H. Ecotoxicogenomics : the challenge of integrating genomics into aquatic and terrestrial ecotoxicology. *Aquatic toxicology* **67**, 143-154 (2004).
- Sparling, D. W., Linder, G. & Bishop, C. A. Ecotoxicology of amphibians and reptiles. A technical publication of Setac, 877p. (2000).
- Stouthart, A. J. H. X., Huijbregts, M. A. J., Balm, P. H. M., Lock, R. A. C. & Wendelaar Bonga, S. E. Endocrine stress response and abnormal development in carp larvae after exposure of the embryos to PCB 126. *Fish. Physiol. Biochem.* **18** (4), 321-329 (1998).
- Streijger, F., Oerlemans, F., Ellenbroek, B. A., Jost, C. R., Wieringa, B. & Van der Zee, C. E. E. M. Structural and behavioural consequences of double deficiency for creatine kinases BCK and UbCKmit. *Behavioural Brain Research* **157**, 219-234 (2005).
- Tabuchi, M., Veldhoen, N., Dangerfield, N., Jeffries, S., Helbing, C. C. & Ross, P. S. PCB-related alteration of thyroid hormones and thyroid hormone receptor gene expression in free-ranging harbor seals (*Phoca vitulina*). *Environmental Health Perspectives* **114** (7), 1024-1031 (2006).
- Takase, C., Nakano, K., Ohta, S., Nakagawa, S. & Matuda, S. Y. Different distribution of dihydrolipoamide succinyltransférase, dihydrolipoamide acetyltransferase and ATP synthase beta-subunit in monkey brain. *In vivo* **10** (5), 495-501 (1996).
- Tata, J. R. Gene expression during metamorphosis – an ideal model for postembryonic development. *Bioessays* **15**, 239-248 (1993).
- Tata, J. R. Amphibian metamorphosis as a model for the developmental actions of thyroid hormone. *Molecular and Cellular Endocrinology* **246**, 10-20 (2006).
- Tilson, H. A., Kodavanti, P. R. S., Mundy, W. R. & Bushnell, P. J. Neurotoxicity of environmental chemicals and their mechanism of action. *Toxicology Letters* **102-103**, 631-635 (1998).
- Tilley, R. E., Kemp, G. D., Teramitsu, I., Hall, A. J. Isolation of two cytochrome P450 cDNAs, CYP1A1 and CYP1A2, from harp seal (*Phoca groenlandica*) and grey seal (*Halichoerus grypus*). *Comparative Biochemistry and Physiology* **132**, 181-191 (2002).
- Tinsley, R. C. & Kobel, H. R. The biology of *Xenopus*. Oxford, Londres, 440p. (1996).
- Van den Bergh, G. & Arckens, L. Fluorescent two-dimensional difference gel electrophoresis unveils the potential of gel-based proteomics. *Current Opinion in Biotechnology* **15**, 38-43 (2004).
- Veldhoen, N., Crump, D., Werry, K. & Helbing, C. C. Distinctive Gene Profiles Occur at Key Points During Natural Metamorphosis in the *Xenopus laevis* Tadpole Tail. *Developmental dynamics* **225**, 457-468 (2002).
- Wallimann, T. & Hemmer, W. Creatine kinase in non-muscle tissues and cells. *Mol. Cell. Biochem.* **133-134**, 193-220 (1994).
- Wirth, D., Gustin, P., Drion, P. V., Dessy-Doize, C. & Christians, E. S. Les protéines de choc thermique (heat shock proteins): classification, structure, fonctions et implications dans les processus pathologiques. *Ann. Méd. Vét.* **146**, 201-216 (2002).
- Yamauchi, K., Takeuchi, H. A., Overall, M., Dziadek, M., Munro, S. L. A. & Schreiber, G. Structural characteristics of bullfrog (*Rana catesbeiana*) tranthyretin and its cDNA : Comparison of its pattern of expression during metamorphosis with that of lipocalin. *Eur. J. Biochem.* **256**, 287-296 (1998).

Yoo, B. C., Kim, S. H., Cairns, N., Fountoulakis, M. & Lubec, G. Deranged expression of molecular chaperones in brains of patients with Alzheimer's disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **280**, 249-258 (2001).

Young Bang, D., Kang, D. & Hee Moon, M. Nanoflow liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the characterization of intact phosphatidylcholines from soybean, bovine brain and liver. *Journal of Chromatography* **1104**, 222-229 (2006).

Yu, M. L., Hsu, C. C., Gladen, B. C. & Rogan, W. J. In utero PCB/PCDF exposure: relation of developmental delay to dysmorphology and dose. *Neurotoxicol. Teratol.* **13** (2), 195-202 (1991).

Zhang, F., Degitz, S. J., Holcombe, G. W., Kosian, P. A., Tietge, J., Veldhoen, N. & Helbing, C. C. Evaluation of gene expression endpoints in the context of a *Xenopus laevis* metamorphosis-based bioassay to detect thyroid hormone disruptors. *Aquatic Toxicology* **76**, 24-36 (2006).

Zhou, J. M., Qin, Z. F., Cong, L. & Xu, X. B. Toxicity of PCBs (Aroclor-1221, 1254) to embryos and larvae of *Xenopus laevis*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **73**, 379-384 (2004).

Zoeller, R. T., Dowling, A. L. S., Herzig, C. T. A., Iannacone, E. A., Gauger, K. J & Bansal, R. Thyroid hormone, brain development and the environment. *Environmental Health Perspectives* **110**, 355-361 (2002).

Zoeller, R. T. Environmental chemicals as thyroid hormone analogues : New studies indicate that thyroid hormone receptors are targets of industrial chemicals ?. *Molecular and Cellular Endocrinology* **242**, 10-15 (2005).

### Thèses :

Bodin, N. Contamination des crustacés décapodes par les composés organohalogénés. Etude détaillée de la bioaccumulation des PCB chez l'araignée de mer *Maja brachydactyla*. Université de Bretagne Occidentale, France (2005).

Cayrou, C. Rôle du récepteur thyroïdien TR beta1 dans le développement neuronal. Université Laval, Canada (2003).

Giguère, A. Les récepteurs nucléaires et synaptosomaux des hormones thyroïdiennes chez l'embryon de poulet : propriétés, ontogenèse et mécanisme d'action. Université de Sherbrooke, Canada (1998).

Gras, R. Structure des espaces de recherche , complexité des algorithmes d'optimisation combinatoire stochastique et applications à la bioinformatique. Université de Rennes, France (2004).

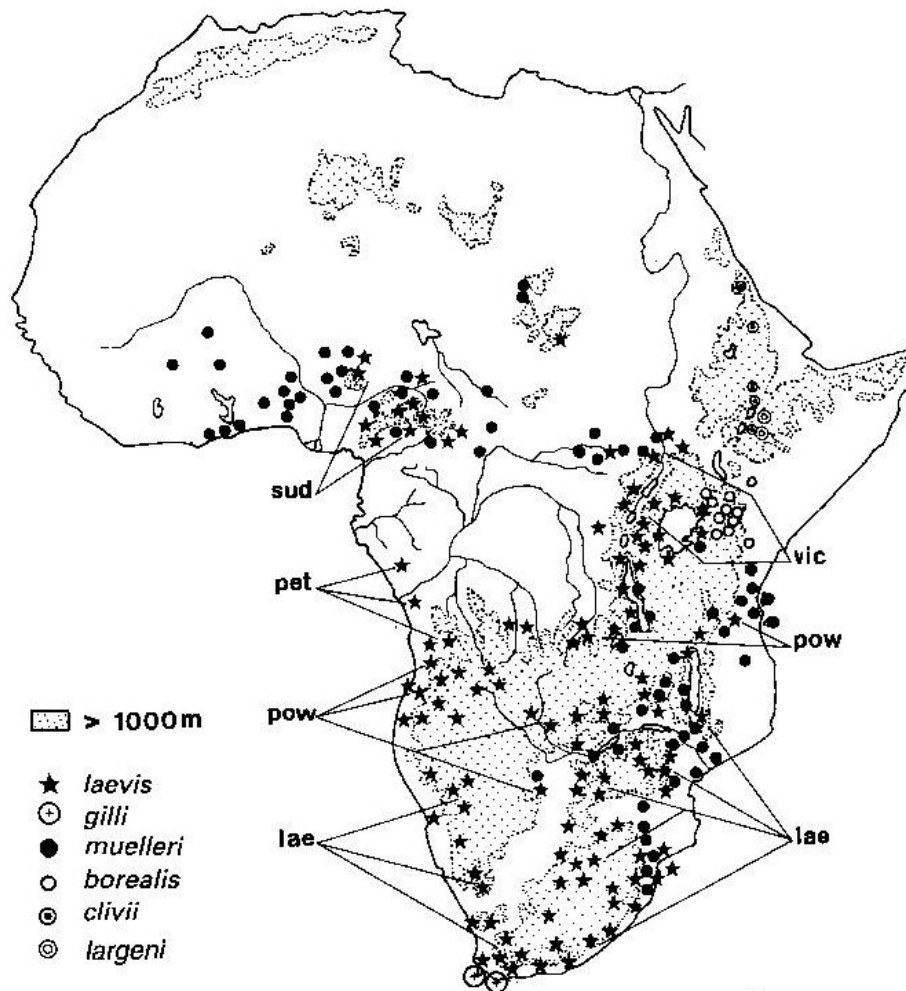
Virot, S. Les petites protéines de stress et leur rôle dans la mort cellulaire. Etude de leur fonction chaperon à travers l'exemple de la mutation R120G de l' $\alpha$ B-cristalline. Université Claude-Bernard- Lyon 1, France (2004).

Sites Internet :

[http://www.chem.unep.ch/pops/POPS\\_Inc/proceedings/bamako/eng/FIEDLER1.html](http://www.chem.unep.ch/pops/POPS_Inc/proceedings/bamako/eng/FIEDLER1.html)  
<http://mapageweb.umontreal.ca/cabanat/bio2460/organo1.html>  
[http://www.ain.fr/vivre/environnement/plan-dechets/pdf/2006\\_04\\_reglementation.pdf](http://www.ain.fr/vivre/environnement/plan-dechets/pdf/2006_04_reglementation.pdf)  
<http://www.fundp.ac.be/sciences/biologie/urbo/proteomique.html>  
<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/xenope1/index.htm>  
[http://www.grenouilles.free.fr/especes/crapaud\\_xenope.php](http://www.grenouilles.free.fr/especes/crapaud_xenope.php)  
<http://www.libnet.ulg.ac.be/spring/dioxin/sld075.htm>  
<http://www.greenfacts.org/en/pcbs/1-2/1-polychlorinated-biphenyls.htm>  
<http://membres.lycos.fr/carcinus/ECOPHYSIOLOGIE/METAMORPHOSE/metam7.htm>  
[http://www2.kenyon.edu/Depts/BioEllipse/courses/biol114/Chap14/Chapter\\_14.html](http://www2.kenyon.edu/Depts/BioEllipse/courses/biol114/Chap14/Chapter_14.html)  
<http://coproweb.free.fr/pagphy/physioan/ch9s2b.htm#2.3.5.c>  
[http://www.pollutionissues.com/images/paz\\_01\\_img0027.jpg](http://www.pollutionissues.com/images/paz_01_img0027.jpg)  
[http://atctoxicologie.free.fr/archi/bibli/les\\_dioxines.pdf](http://atctoxicologie.free.fr/archi/bibli/les_dioxines.pdf)  
<http://www.aquadocinter.hu/themes/Dioxin/Dioxin20030703.htm>  
[http://www.ain.fr/vivre/environnement/plan-dechets/pdf/2006\\_04\\_reglementation.pdf](http://www.ain.fr/vivre/environnement/plan-dechets/pdf/2006_04_reglementation.pdf)  
<http://coproweb.free.fr/pagphy/physioan/ch9s2b.htm#2.3.5.c>  
<http://www.medicine.manchester.ac.uk/cancerstudies/lrf/>  
<http://www-cbd.ups-tlse.fr/organismes/nieuwkoop/nieuwkoop.html>  
[http://www.swarthmore.edu/NatSci/sgilber1/DB\\_lab/Frog/frog\\_staging.html](http://www.swarthmore.edu/NatSci/sgilber1/DB_lab/Frog/frog_staging.html)  
<http://www.med.univ-rennes1.fr/sisrai/dico/S104.html>  
<http://www.alzheimer-paris.org>



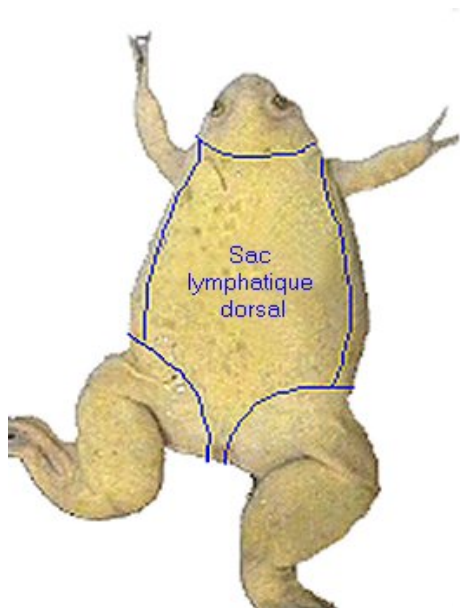
**Figure II.1 :** Le xénope *Xenopus laevis* ([www.snv.jussieu.fr/bmedia/xenope1/index.htm](http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/xenope1/index.htm)).



**Figure II.2 :** Répartition géographique des différentes espèces et sous-espèces de xénopes (Shi, 2000).



**Figure II.3 :** Photo de femelles de *Xenopus laevis* dans les bacs d'élevage au sein de l'Unité de Recherche en Biologie des Organismes des FUNDP.



**Figure II.4 :** Sac lymphatique dorsal de *Xenopus laevis* ([www.snv.jussieu.fr/bmedia/xenope1/index.htm](http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/xenope1/index.htm)).



**Figure II.5 :** Injection d'hCG dans le sac lymphatique dorsal de l'animal.

**Tableau II.1** : Solution Ringer pour amphibiens.

<i>Solution stock (à diluer 10x avant usage)</i>	
NaCl	660mg
KCl	15 mg
CaCl <sub>2</sub> (liquide)	15µl
NaHCO <sub>3</sub>	15mg
H <sub>2</sub> O bidistillée	100ml

**Tableau II.2** : Composition de la solution FETAX-medium.

Pour un volume de 1l d'eau bidistillée (solution stock à diluer 10x avant usage)	
NaCl	625mg
NaHCO <sub>3</sub>	96mg
KCl	30mg
CaSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	60mg
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	75mg
CaCl <sub>2</sub>	15µl

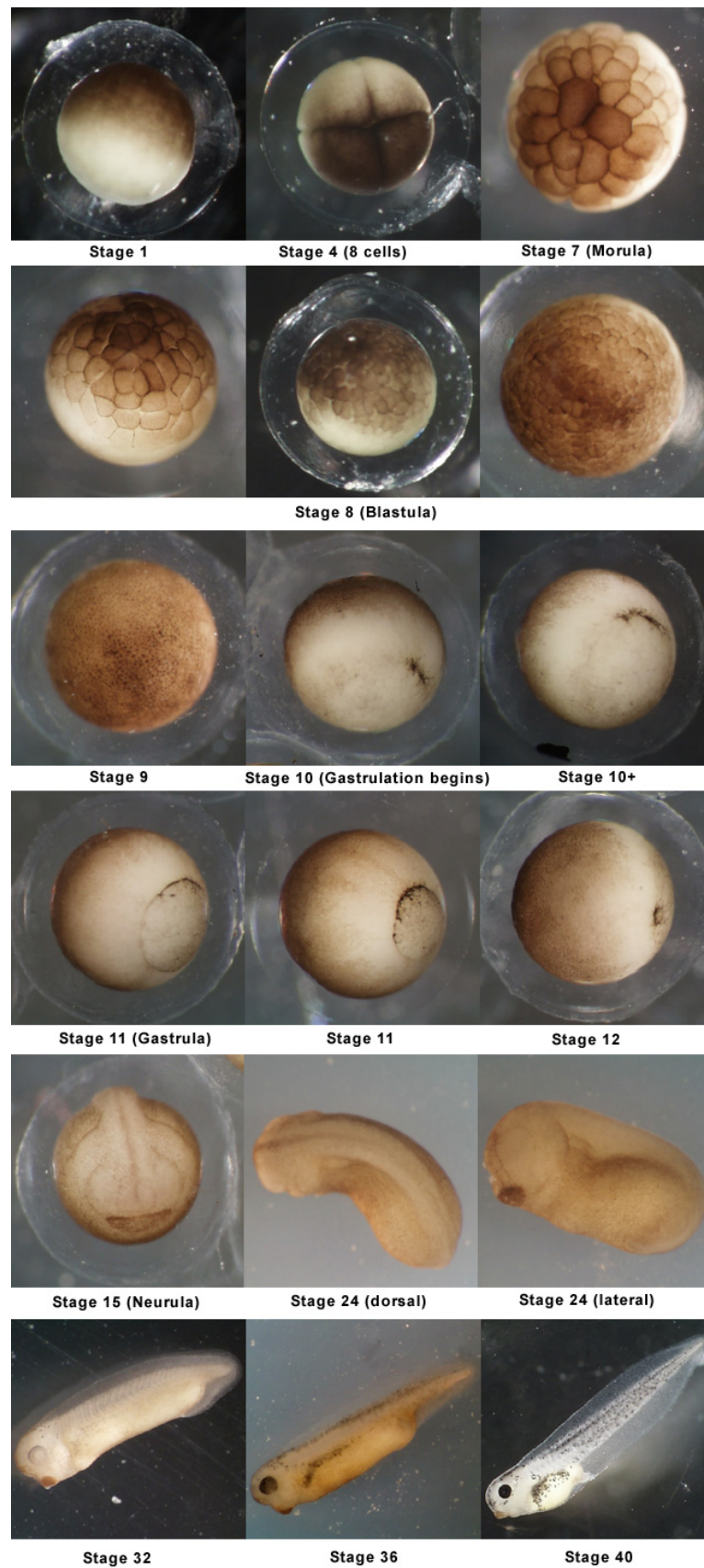


**Figure II.6 :** Bac de ponte (en bleu) dans lequel se trouvent les géniteurs.



**Figure II.7 :** Ponte de *Xenopus laevis*  
(<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/XenAnimaLabo/index.html>).

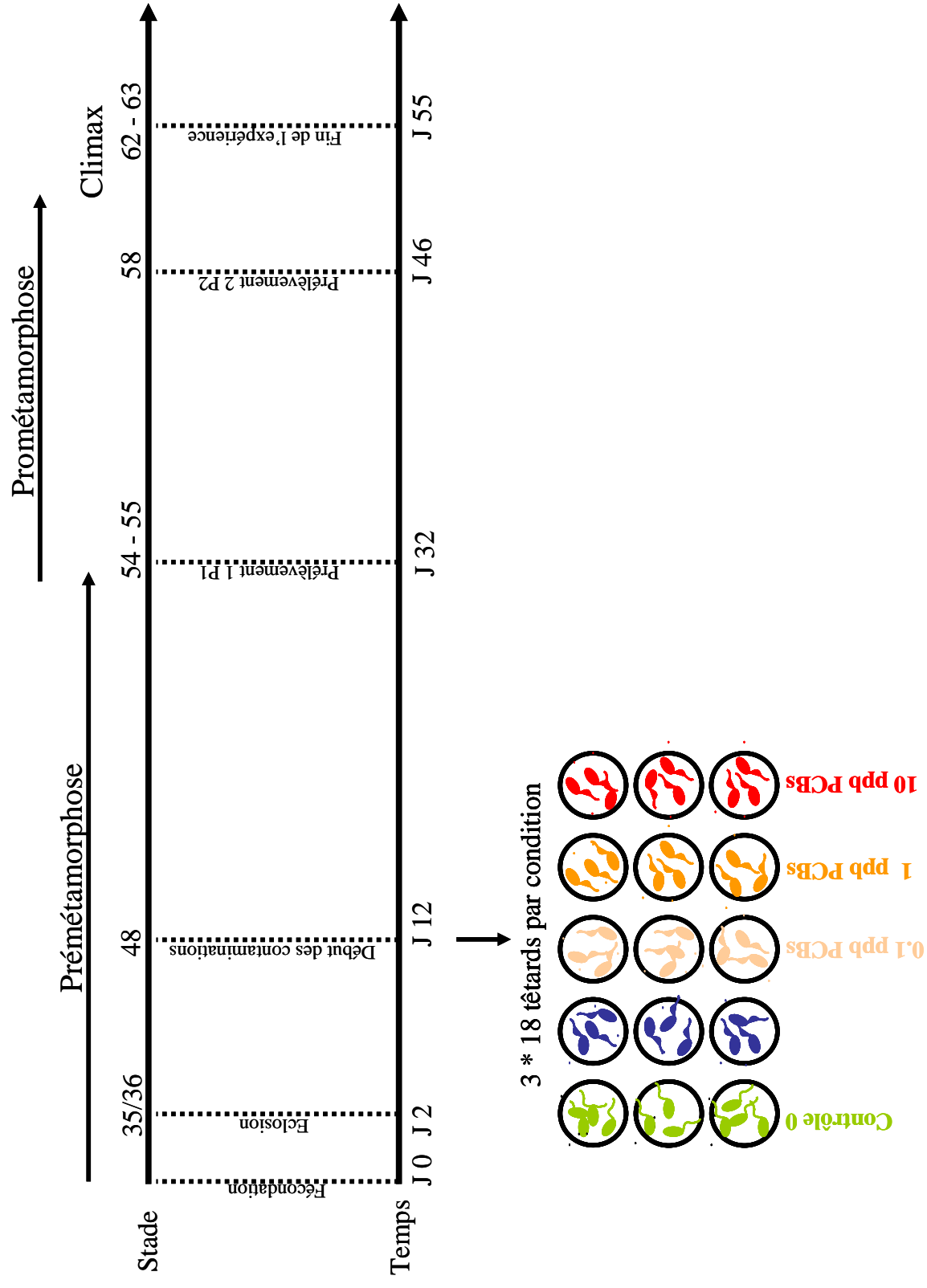




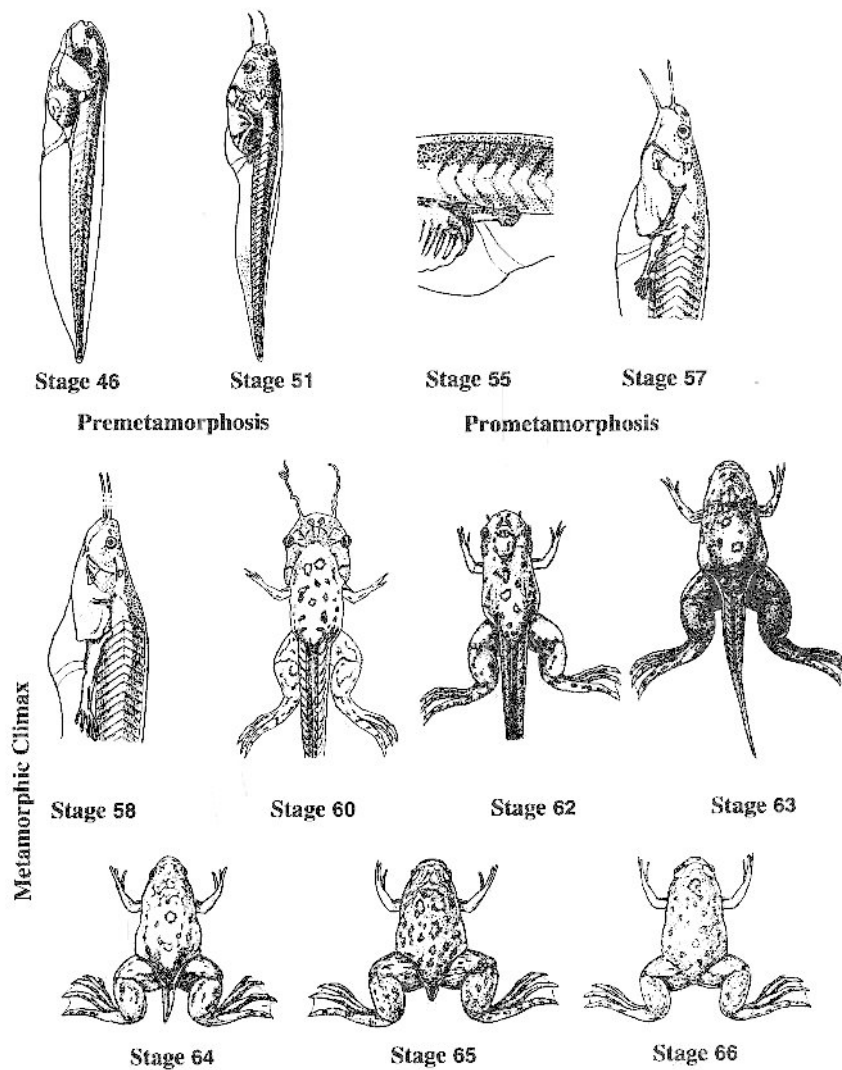
**Figure II.8 :** Œufs de *Xenopus laevis* en division cellulaire  
 ([www.swarthmore.edu/NatSci/sgilber1/DB\\_lab/Frog/frog\\_staging.html](http://www.swarthmore.edu/NatSci/sgilber1/DB_lab/Frog/frog_staging.html)).



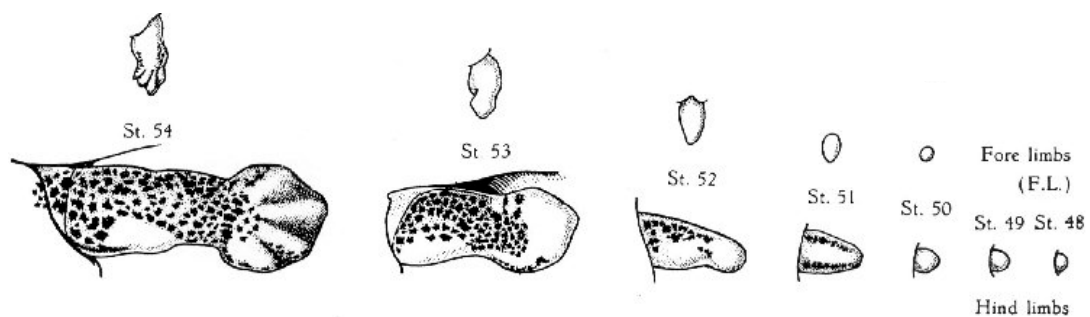
**Figure II.9 :** Système aménagé pour la manipulation.



**Figure II.10 :** Illustration du plan expérimental et d'échantillonnage.



**Figure II.11 :** Représentation des étapes de développement des têtards de *Xenopus laevis* selon Nieuwkoop et Faber, 1956 (Shi, 2000).



**Figure II.12 :** Evolution des bourgeons des membres antérieurs et postérieurs (<http://www-cbd.ups-tlse.fr/organismes/nieuwkoop/nieuwkoop.html>).



**Tableau II.3 :** Composition de la solution pH 7.

Solution A	625 µl
Solution B	500 ml

Remarque : Composition de la solution A .

Acide acétique	11,5 ml
Eau bidistillée	1 l

Composition de la solution B.

Sodium acétate anhydre	16,4 g
Eau bidistillée	1 l

**Tableau II.4 :** Composition de la solution pH 4.

Solution A	250 ml
Solution B	45 ml

**Tableau II.5 :** Composition de la solution pH 3.

Solution A	250 ml
Solution B	2,5 ml



**Tableau II.6 :** Composition de la solution BSA - tampon barbital.

	Concentration finale
Tampon barbital	
BSA	1 %

*Remarque :* Composition du tampon barbital de base.

	Concentration finale
Sodium barbital	0,05 M
Azide de sodium	0,05 M
EDTA	0,05 M

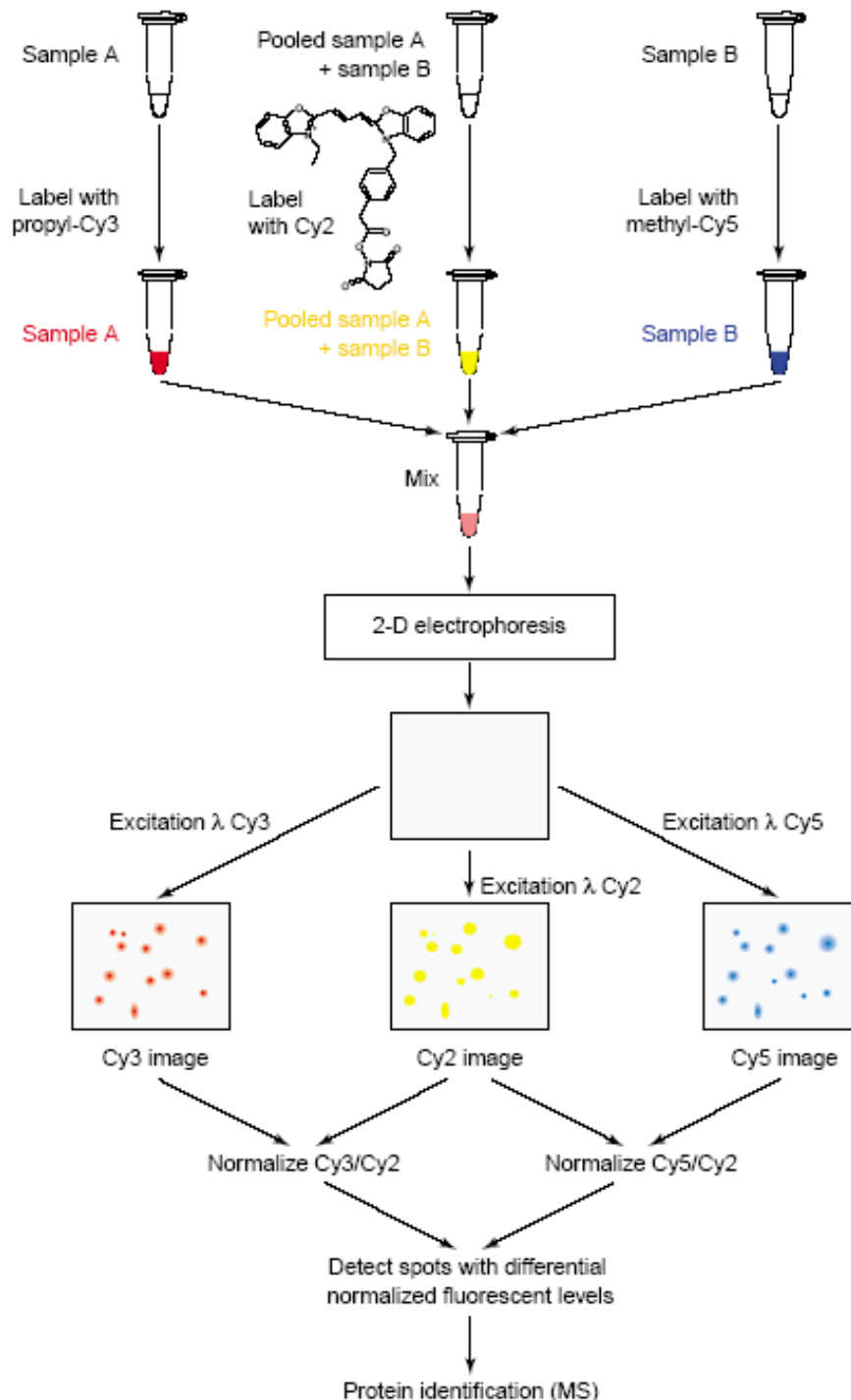
**Tableau II.7 :** Composition de la solution BSA – tampon barbital – ANS.

	Concentration finale
Tampon barbital	
BSA	1 %
ANS	0,15 %

**Tableau II.8 :** Composition du tampon barbital de base.

	Concentration finale
Sodium barbital	0,05 M
Azide de sodium	0,05 M
EDTA	0,05 M





**Figure II.13 :** Schéma représentant une expérience en 2D-DIGE avec un standard interne et 3 cyanines fluorescentes. Les échantillons A et B sont marqués avec soit Cy3 soit Cy5, mais un standard interne est aussi réalisé à partir de quantités identiques de tous les échantillons de l'expérience et est marqué avec Cy2. Après avoir mélangé ces échantillons de protéines et réalisé la 2<sup>ème</sup> dimension, les profils d'expression respectifs des protéines sont ensuite visualisés par illumination du gel avec des longueurs d'onde d'excitation spécifiques. Les intensités des spots des protéines A et B peuvent être maintenant normalisées en divisant chaque intensité de spot par l'intensité du spot correspondant du standard interne (Van den Bergh et Arckens, 2004).

**Tableau II.9 :** Composition du tampon de lyse DLA.

	Concentration finale
Urée	7 M
Thiourée	2 M
CHAPS	4 %
Tris	30 mM
pH	8,5

**Tableau II.10 :** Répartition des échantillons pour le 2D-DIGE.

Gel	Cyanine 2 (= Standard Interne)	Cyanine 3	Cyanine 5
<b>Gel 1</b>	25µg répartis sur tous les échantillons : P1dmT2 ; P1dmT3 ; P1dmT4 ; P1dmT5 ; P11T4 ; P11T5 ; P11T7 ; P11T9 ; P110T2 ; P110T5 ; P110T6 ; P110T8.	25µg de protéines de P1dmT2	25 µg de protéines de P110T6
<b>Gel 2</b>	25µg répartis sur tous les échantillons : P1dmT2 ; P1dmT3 ; P1dmT4 ; P1dmT5 ; P11T4 ; P11T5 ; P11T7 ; P11T9 ; P110T2 ; P110T5 ; P110T6 ; P110T8.	25µg de protéines de P1dmT3	25µg de protéines de P11T5
<b>Gel 3</b>	25µg répartis sur tous les échantillons : P1dmT2 ; P1dmT3 ; P1dmT4 ; P1dmT5 ; P11T4 ; P11T5 ; P11T7 ; P11T9 ; P110T2 ; P110T5 ; P110T6 ; P110T8.	25µg de protéines de P110T2	25µg de protéines de P11T4
<b>Gel 4</b>	25µg répartis sur tous les échantillons : P1dmT2 ; P1dmT3 ; P1dmT4 ; P1dmT5 ; P11T4 ; P11T5 ; P11T7 ; P11T9 ; P110T2 ; P110T5 ; P110T6 ; P110T8.	25µg de protéines de P110T5	25µg de protéines de P1dmT5
<b>Gel 5</b>	25µg répartis sur tous les échantillons : P1dmT2 ; P1dmT3 ; P1dmT4 ; P1dmT5 ; P11T4 ; P11T5 ; P11T7 ; P11T9 ; P110T2 ; P110T5 ; P110T6 ; P110T8.	25µg de protéines de P11T7	25µg de protéines de P110T8
<b>Gel 6</b>	25µg répartis sur tous les échantillons : P1dmT2 ; P1dmT3 ; P1dmT4 ; P1dmT5 ; P11T4 ; P11T5 ; P11T7 ; P11T9 ; P110T2 ; P110T5 ; P110T6 ; P110T8.	25µg de protéines de P11T9	25µg de protéines de P1dmT4

Remarque : **P1dmT2** = prélèvement 1, traitement DMSO, têtard n°2 ; **P1dmT3** = prélèvement 1, traitement DMSO, têtard n°3 ; **P1dmT4** = prélèvement 1, traitement DMSO, têtard n°4 ; **P1dmT5** = prélèvement 1, traitement DMSO, têtard n°5 ; **P11T4** = prélèvement 1, traitement 1 ppb, têtard n°4 ; **P11T5** = prélèvement 1, traitement 1 ppb, têtard n°5 ; **P11T7** = prélèvement 1, traitement 1 ppb, têtard n°7 ; **P11T9** = prélèvement 1, traitement 1 ppb, têtard n°9 ; **P110T2** = prélèvement 1, traitement 10 ppb, têtard n°2 ; **P110T5** = prélèvement 1, traitement 10 ppb, têtard n°5 ; **P110T6** = prélèvement 1, traitement 10 ppb, têtard n°6 et **P110T8** = prélèvement 1, traitement 10 ppb, têtard n°8.

**Tableau II.11 :** Composition du tampon de réduction pour l'analyse en 2D-DIGE.

Concentration finale	
Urée	7 M
Thiourée	2 M
CHAPS	2 %
DTT	2 %
IPG	2 %

**Tableau II.12 :** Composition du tampon de réhydratation des gels 1D.

Concentration finale	
Urée	7 M
Thiourée	2 M
CHAPS	2 %
Bleu de bromophénol	10 µl
IPG 4-7	0,5 %
DTT	2 %

**Tableau II.13 :** Programme suivi par l'IPGphor.

Pour des gels de 24cm	
Etape 1 : Step and hold	300 V – 3 h
Etape 2 : Gradient	1000 V – 6 ou 8 h
Etape 3 : Gradient	8000 V – 3 h
Etape 4 : Step and hold	8000 V – 50000 Vh

**Tableau II.14 :** Composition des gels d'acrylamide 12,5%, pour la 2<sup>ème</sup> dimension.

Pour 6 gels	
Acryl/bis 30%-0,8%	188 ml
Tris-HCl 1,5M pH8,8	113 ml
H <sub>2</sub> O bidistillée	142 ml
SDS 10%	4,5 ml
Temed pur	62 µl
APS 10%	4,5 µl

**Tableau II.15 :** Composition du tampon d'équilibration.

	Pour 6 gels
Tris-HCl 1,5M pH 8,8	2,35 ml
Urée	25,22 g
Glycérol 87%	24,15 ml
SDS 2%	1,4 g
H <sub>2</sub> O bidistillée	→ 70 ml

**Tableau II.15a :** Composition du tampon d'équilibration contenant du DTT.

	Pour 6 gels
Tampon d'équilibration	35 ml
DTT	350 mg

**Tableau II.15b :** Composition du tampon d'équilibration contenant de l'iodoacétamide.

	Pour 6 gels
Tampon d'équilibration	35 ml
Iodoacétamide	875 mg

**Tableau II.16 :** Composition de la solution d'agarose.

Tampon d'électrophorèse	250 ml
Agarose	1,25 g
Bleu de bromophénol	

**Tableau II.17 :** Composition du tampon d'électrophorèse.

Tris	30,24 g
Glycine	144 g
SDS	10 g
H <sub>2</sub> O bidistillée	1 l

**Tableau II.18 :** Composition du bain de fixation.

	Concentration finale
Ethanol	40 %
Acide acétique	10 %

**Tableau II.19 :** Composition de la solution d'incubation.

	Concentration finale
Ethanol	33,3 %
Na acétate . 3H <sub>2</sub> O	72,3 g/l
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .5H <sub>2</sub> O	2,1 g/l
Glutaraldéhyde (50%)	0,13 %

**Tableau II.20 :** Composition de la solution de coloration à l'argent.

	Concentration finale
Nitrate d'argent	1 g/l
Formaldéhyde (37%)	0,012 %

**Tableau II.21 :** Composition de la solution Developing.

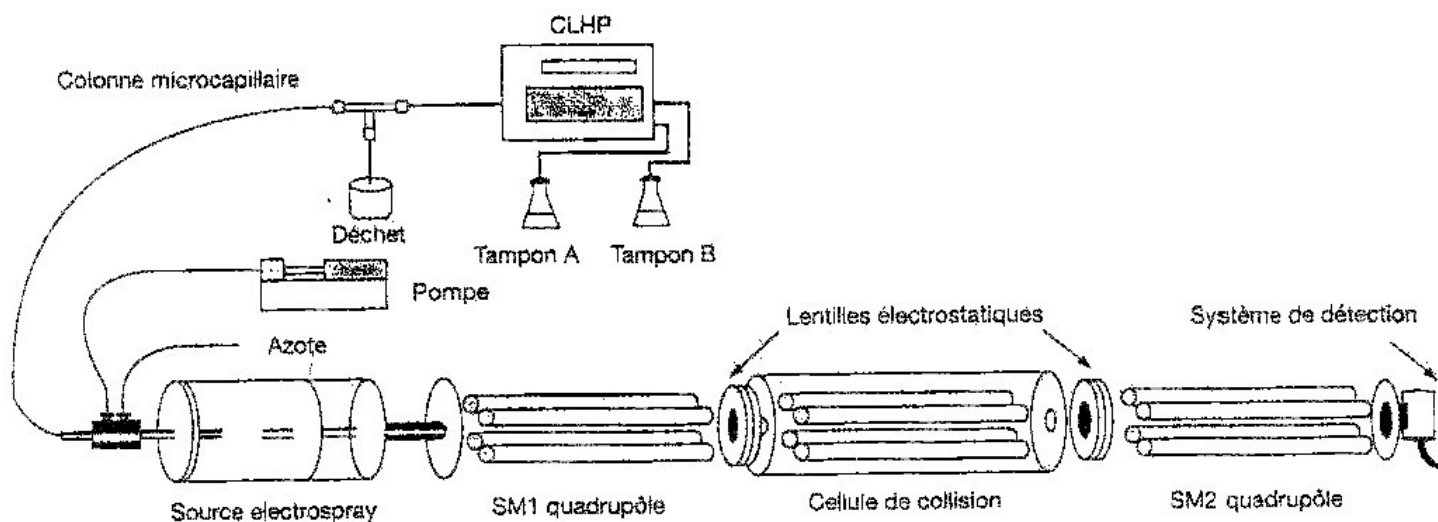
	Concentration finale
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	25 g/l
Formaldéhyde (37%)	0,007 %

**Tableau II.22 :** Composition de la solution Stop.

	Concentration finale
EDTA	14,6 g/l

**Tableau II.23 :** Composition de la solution de fixation pour la coloration au krypton.

	Concentration finale
Ethanol	40 %
Acide acétique	10 %



**Figure II.14 :** Figure représentant la configuration d'un appareil de spectrométrie de masse en tandem. Le système de chromatographie liquide haute performance est équipé d'un microdérivateur et est couplé à un spectromètre de masse à quadrupôle avec source électrospray (Dongré *et al.*, 1998).

# Protocole de dosage des PCBs dans les organismes

Ce protocole provient du Laboratoire d'Ecologie Aquatique et Ecotoxicologie du Professeur Jean-Pierre Thomé à l'Université de Liège. Dans notre cas, la partie dissection n'est pas appliquée.

## Sommaire :

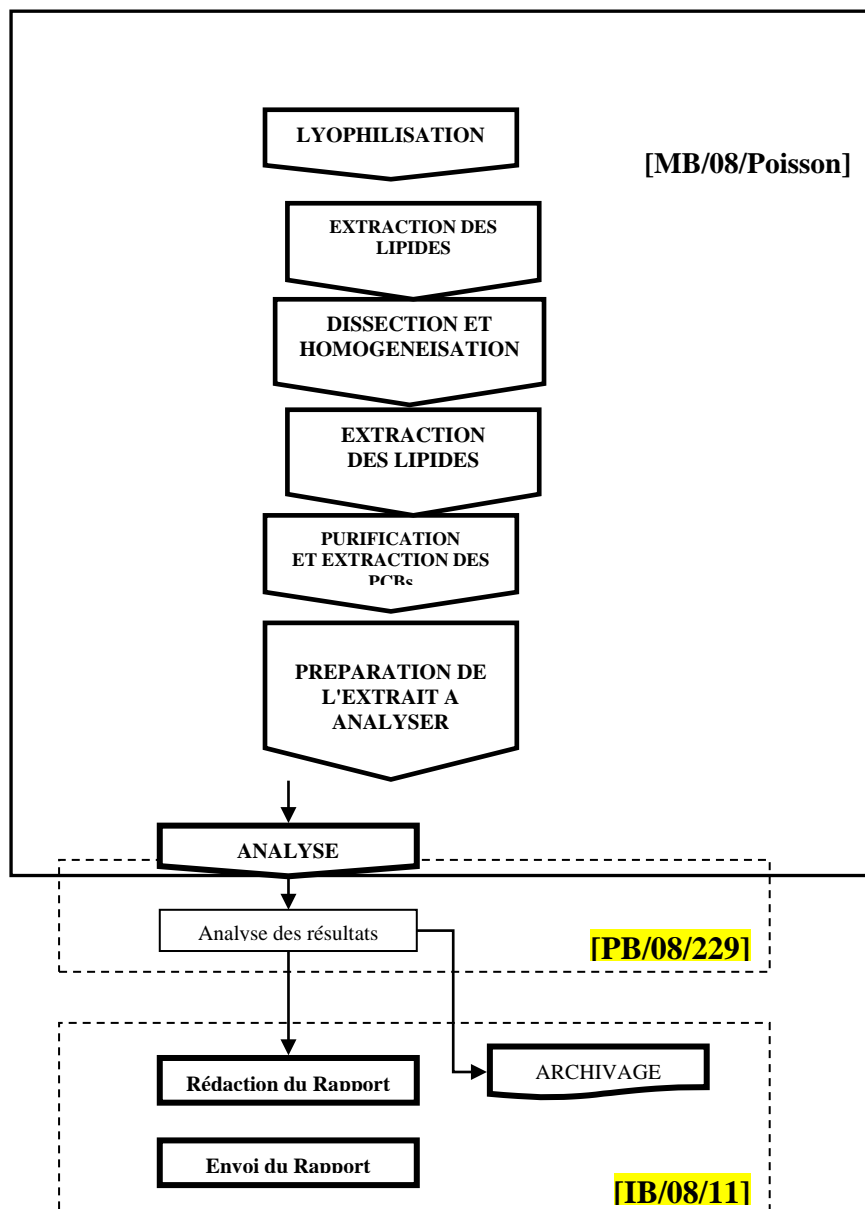
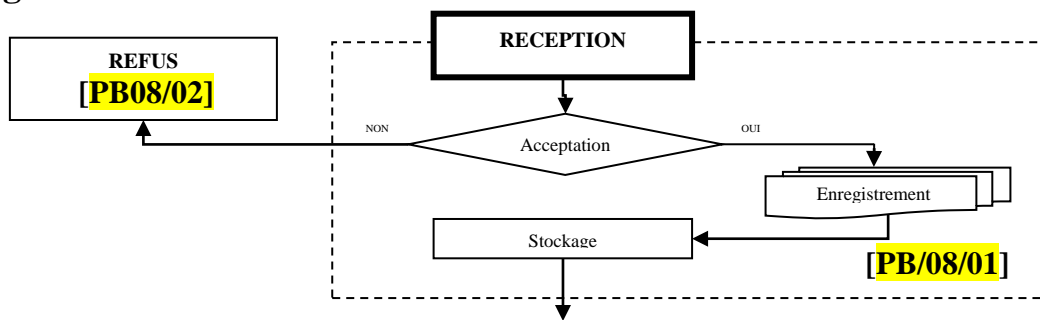
1.	Liste des Modifications successives : .....	
2.	Sommaire : .....	1
3.	Objet : .....	2
4.	Logigramme : .....	3
5.	Mode opératoire : .....	4
6.	Dissection et homogénéisation de l'échantillon.....	4
6.1	Appareils .....	4
6.2	Petit matériel, verrerie et consommables .....	4
6.3	Dissection , prélèvement et homogénéisation des échantillons .....	4
6.4	Nettoyage du matériel .....	8
7.	Lyophilisation des échantillons : .....	8
7.1	Appareils .....	8
7.2	Petit matériel, verrerie et consommables .....	8
7.3	Lyophilisation.....	8
8.	Extraction des lipides : .....	9
8.1	Appareils .....	9
8.2	Petit matériel, verrerie et consommables .....	10
8.3	Méthodes d'extraction .....	11
9.	Purification de l'extrait et extraction des PCBs .....	14
9.1	Appareils .....	14
9.2	Petit matériel, verrerie et consommables .....	14
9.3	Préparation des solutions.....	15
9.4	Reprise des extraits à purifier.....	16
9.5	Clean-up acide.....	17
9.6	Clean-up Florisil.....	17
10.	Préparation de l'extrait à analyser.....	18
10.1	Appareils .....	18
10.2	Petit matériel, verrerie et consommables .....	18
10.3	Préparation de la solution de standart interne .....	18
10.4	Conditionnement de l'extrait à injecter en GC/ECD .....	19
11.	Contrôle et Assurance Qualité : .....	19
12.	Enregistrement relalifs Qualité : .....	20
13.	Responsabilité : .....	20

## **Objet :**

Ce Mode Opératoire est la Méthode Générale décrivant les différentes étapes nécessaires à l'extraction des dioxines (PCDD's), furannes (PCDF's), polychlorobiphényles (PCB's) et polychlorobiphényles coplanaires (cPCB's) à partir d'échantillons de D.A. (denrées alimentaires) de type « Poisson ».



## Logigramme :



## **Mode opératoire :**

Le logigramme du mode opératoire MB/08/poisson se découpe en 5 parties qui font référence aux modes d'utilisation détaillés des appareils utilisés et à la fiche d'enregistrement [EB/08/poisson] :

- ◇ La dissection, l'homogénéisation et le prélèvement des différents échantillons
- ◇ La lyophilisation éventuelle des échantillons
- ◇ Les méthodes d'extractions des lipides des différents échantillons
- ◇ La purification des extraits et l'extraction des PCBs

## **Dissection et homogénéisation de l'échantillon.**

### **Appareils**

- [A-061] : Broyeur RETSCH Grindomix GM 200
- [A-061/1] : Bol en verre du Broyeur RETSCH Grindomix GM 200
- [A-061/2] : Réducteur du Broyeur RETSCH Grindomix GM 200
- [024-A] : Balance de précision AT261 METTLER TOLEDO

### **Petit matériel, verrerie et consommables**

- [189]-xP484 : Planche à découper
- [197] : Ciseaux
- [142]-xP438 : Pince
- [192] : Spatule
- [193] : Spatule
- [188]-xP482 : Bistouri
- [187]-xP483 : Lame
- [286]-xP708 : Papier d'aluminium
- [288] : sachets en plastique
- [282] : Papier M-Tork
- [284] : Decontamin
- [49] : Norvanol
- [XXX?] : Eau déminéralisée
- [166] : Vials EPA pour lyophilisation
- [167] : Tubes à essai

## **Dissection , prélèvement et homogénéisation des échantillons**

La dissection doit être effectuée par une personne compétente en la matière.  
Trois types de matrices sont prélevées.

### Graisse

Le prélèvement du tissu adipeux n'est pas toujours possible et dépend fortement de la nature du poisson.

Si le prélèvement est possible, découper à l'aide d'une pince [142]-xP438 et d'un bistouri [188]-xP482, 3 parties aliquotes de tissu adipeux sous-cutané à différents endroits de l'échantillon.

Le prélèvement peut varier d'une espèce à l'autre avec un minimum de environ 100mg et un maximum de environ 1g.

Si le poisson est très gras, trois parties aliquotes doivent être prélevées à différents endroits de la couche graisseuse sous-cutanée.

La graisse prélevée est placée dans un tube à essai [167] portant le numéro de l'échantillon et préalablement taré afin d'avoir une estimation grossière de la quantité obtenue et à pouvoir la comparer avec le poids désiré.

### Foie

Prélever le foie du poisson à l'aide d'une pince [142]-xP438 et d'un bistouri [188]-xP482.

Au moyen de la balance de précision AT261 METTLER TOLEDO [024-A] (Mode d'utilisation [XXX]), tarer un vial EPA marqué du numéro de l'échantillon sans son bouchon à visser, imprimer la tare et l'identifier sur le listing de l'imprimante de la balance.

Déposer le foie dans le vial taré à l'aide d'une spatule [192] ou [193], éclater le foie et homogénéiser l'échantillon.

Au moyen de la balance de précision AT261 METTLER TOLEDO [024-A] (Mode d'utilisation [XXX]), peser à nouveau le récipient sans son bouchon à visser, imprimer son poids et l'identifier sur le listing de l'imprimante de la balance.

Calculer le poids frais de l'échantillon par différence entre le poids et la tare du vial et indiquer le poids frais de l'échantillon sur la fiche de suivi d'échantillon [EB/08/poisson] dans la case prévue à cet effet.

Pour une lyophilisation optimale, la quantité d'échantillon ne doit cependant pas excéder 8g par vial. Il est donc parfois nécessaire de répartir l'échantillon dans plusieurs récipients, chaque récipient étant marqué au numéro de l'échantillon.

Au moyen de la balance de précision AT261 METTLER TOLEDO [024-A] (Mode d'utilisation [XXX]), tarer un (des) vial(s) EPA marqué(s) au numéro de l'échantillon sans son(leurs) bouchon(s) à visser, imprimer la(les) tare(s) et l'(les) identifier sur le listing de l'imprimante de la balance.

Répartir une quantité adaptée de foie dans le(s) vial(s) taré(s) à l'aide d'une spatule [192] ou [193].

Au moyen de la balance de précision AT261 METTLER TOLEDO [024-A] (Mode d'utilisation [XXX]), peser à nouveau le(s) récipient(s) sans son(leurs) bouchon(s) à visser, imprimer leur(s) poids(s) et l'identifier sur le listing de l'imprimante de la balance.

Calculer le poids frais d'échantillon dans chacun des vials par différence entre le poids et la tare du vial et indiquer le poids frais total de chaque échantillon (en sommant les poids frais contenus dans chacun des récipients contenant un même échantillon) sur la fiche de suivi d'échantillon [EB/08/poisson] dans la case prévue à cet effet.

### Muscle

La quantité d'échantillon à prélever dépend fortement de l'espèce du poisson à analyser et de sa teneur en matière grasse. Le tableau 6.1 donne des valeurs moyenne des rapports poids

frais/poids sec et poids de lipides / poids sec de quelques espèces afin de pouvoir adapter le poids frais d'échantillon à prélever de façon à obtenir idéalement environ 500mg de lipides après extraction.

Espèce	Matrice	Rapport poids de lipides/poids sec (%)	Rapport poids sec/poids frais (%)
Goujon	Foie	56	40
	Muscle	8	20
Brème	Foie	10-30	23-30
	Muscle	3-7	20
Gardon	Foie	20-47	22-34
	Muscle	5-6	18-23
Poisson chat	Foie	-	-
	Muscle	22-23	8-9

**Tableau 6.1 : Composition moyenne de différentes espèces de poissons**

D'une manière générale, on peut approximativement considérer que le poids d'échantillon lyophilisé représente environ 20% du poids frais de muscle de poisson, ce pourcentage étant légèrement plus élevé (jusqu'à 30 ou 40%) en ce qui concerne le foie.

La "Table belge de composition des aliments" éditée par l'ASBL Nubel (document [DB/08/XXX]), peut également donner des indications sur la teneur en lipides des poissons comestibles les plus communs. Le Tableau 6.2 en reproduit quelques chiffres.

Espèce	Teneur en lipides (en g) pour 100g d'aliment
Anchois commun	2.3
Anguille	24.5
Brochet du Nord	0.9
Cabillaud	0.6
Carpe	4.8
Dorade	2.8
Eglefin	0.6
Flétan	3.6
Hareng	18.0
Lieu noir	1.2
Limande	1.2
Lotte	0.7
Loup de mer	2.9
Maatjes	22.6
Maquereau	11.9
Merlan	0.3
Merlu	0.9

Perche	0.8
Plie	2.0
Raie	0.2
Rascasse du Nord	3.6
Sandre	0.7
Sardine	5.2
Saumon	13.6
Sole	1.4
Tanche	0.4
Truite	5.8
Truite saumonée	7.9
Turbot	1.8

**Tableau 6.2 : Teneur en lipides (en g) pour 100g d'aliment de poissons comestibles**  
**Extrait du "Nubel"(document [DB/08/XXX])**

***! Remarque importante***

*Les différents volumes, concentrations et quantités d'échantillon mentionnées dans ce mode opératoire décrivent les conditions permettant d'atteindre une limite de quantification de 5 ppb par rapport à la graisse (ng de congénère PCB/g de lipides).*

*S'il s'avère que l'échantillon contient une quantité de PCBs supérieure à 50 ppb par congénère (ce qui correspond, dans les conditions décrites dans ce mode opératoire, à une concentration supérieure à environ 100pg/µl dans l'extrait final). Il convient évidemment d'adapter la prise d'échantillon en fonction.*

*Une alternative peut-être d'adapter le volume de reprise de l'extrait final (dilution) comme il en est fait mention au point 10 de ce mode opératoire.*

Prélever du muscle à 3 endroits différents du poisson. Pour ce faire, entailler la peau, la soulever avec une pince [142]-xP438 pour accéder au muscle.

Placer les 3 parties aliquotes dans le broyeur RETSCH Grindomix GM 200 [A-061] (Mode d'utilisation [XXX]) muni de son bol en verre [A-061/1] et de son réducteur [A-061/2].

Broyer pendant 2 minutes à 2000 tours/min une quantité d'échantillon au moins double de la quantité estimée nécessaire à l'obtention de 500mg de graisse.

Pour une lyophilisation optimale, la quantité d'échantillon ne doit pas excéder 8g par vial. Il est donc généralement nécessaire de répartir l'échantillon dans plusieurs récipients, chaque récipient étant marqué au numéro de l'échantillon.

Au moyen de la balance de précision AT261 METTLER TOLEDO [024-A] (Mode d'utilisation [XXX]), tarer un (des) vial(s) EPA marqué(s) au numéro de l'échantillon sans son(leurs) bouchon(s) à visser, imprimer la(les) tare(s) et l'(les)identifier sur le listing de l'imprimante de la balance.

Répartir la quantité nécessaire de muscle broyé dans le(s) vial(s) taré(s) à l'aide d'une spatule [192] ou [193].

Au moyen de la balance de précision AT261 METTLER TOLEDO [024-A] (Mode d'utilisation [XXX]), peser à nouveau le(s) récipient(s) sans son(leurs) bouchon(s) à visser, imprimer leur(s) poids et l'(les)identifier sur le listing de l'imprimante de la balance.

Calculer le poids frais d'échantillon dans chacun des vials par différence entre le poids et la tare du vial et indiquer le poids frais total de chaque échantillon (en sommant les poids frais contenus dans chacun des récipients contenant un même échantillon) sur la fiche de suivi d'échantillon [EB/08/poisson] dans la case prévue à cet effet.

Le muscle broyé excédentaire est emballé dans du papier d'aluminium[286]-xP708 ,placé dans un sachet en plastique [288] portant le numéro de l'échantillon et conservé au congélateur.

Le poisson disséqué est emballé, identifié et conservé de la même manière.

### **Nettoyage du matériel**

Entre chaque échantillon, chacun des outils ou matériel utilisés doit être nettoyé comme suit :

- Essuyer soigneusement chacun des outils au papier M-Tork [282]
- Rincer à l'eau dure
- Nettoyer avec une solution de décontamin [284]dans l'eau chaude
- Rincer à l'eau dure
- Rincer à l'eau déminéralisée [XXX?]
- Rincer au norvanol [49]
- Essuyer soigneusement chacun des outils au papier M-Tork [282]

### **Lyophilisation des échantillons :**

#### **Appareils**

- [A-038] : Lyophilisateur BENCHTOP 3L Sentry VIRTIS
- [024-A] : Balance de précision AT261 METTLER TOLEDO
- [A-015] : Tourie pour conserver l'azote liquide 5DS TAYLOR-WHARTON

### **Petit matériel, verrerie et consommables**

- [166] : Vials certifiés EPA
- [127] : Filtres GFC
- [144] : Azote liquide
- [176] : Fioles de lyophilisation VIRTIS 600ml
- [178] : bouchons pour fioles de lyophilisation VIRTIS
- [181] : manchons en verre pour bouchons pour fioles de lyophilisation VIRTIS
- [180] : O-ring pour fioles de lyophilisation VIRTIS
- [179] : Filtres pour fioles de lyophilisation VIRTIS

### **Lyophilisation**

#### **Préparation de l'échantillon**

Retirer les septum en téflon des bouchons à visser des vials EPA [166] préparés au point 6.3.2 ou 6.3.3, les réserver et les remplacer par des filtres GFC [127] préalablement découpés à bonne dimension.

Remplacer un bouchon ainsi muni d'un filtre sur chaque vial EPA [166] contenant les échantillons à lyophiliser.

Placer délicatement les vials EPA contenant les échantillons à lyophiliser dans la tourie 5DS TAYLOR-WHARTON [A-015] préalablement remplie d'azote liquide (Mode d'utilisation [XXX]). La tourie peut contenir au maximum 8 vials qui doivent plonger dans l'azote liquide pendant 10 minutes au moins, pour atteindre une température d'environ  $-50^{\circ}\text{C}$ .

Les vials congelés sont alors introduits dans de fioles de lyophilisation VIRTIS [176]. Celles-ci sont refermées à l'aide de leurs bouchons [178] dont les filtres [179] et les O-ring [180] ont été contrôlés.

Chaque fiole de lyophilisation VIRTIS peut contenir au maximum 6 vials EPA

### Lyophilisation

Procéder au démarrage du lyophilisateur et à l'installation des fioles de lyophilisation VIRTIS suivant le mode d'utilisation [XXX].

Vérifier que le vide s'opère bien.

Laisser lyophiliser les échantillons pendant environ 16h.

Retirer ensuite les fioles de lyophilisation VIRTIS suivant le mode d'utilisation [XXX].

Retirer les vials des fioles de lyophilisation.

Au moyen de la balance de précision AT261 METTLER TOLEDO [024-A] (Mode d'utilisation [XXX]), peser le(s) récipient(s) sans son(leurs) bouchon(s) à visser, imprimer leur(s) poids et l'(les)identifier sur le listing de l'imprimante de la balance.

Calculer le poids sec d'échantillon dans chacun des vials par différence entre le poids et la tare du vial et indiquer le poids sec total de chaque échantillon (éventuellement en sommant les poids secs contenus dans chacun des récipients contenant un même échantillon si celui-ci a dû être réparti dans différents vials de lyophilisation) sur la fiche de suivi d'échantillon [EB/08/Poisson] dans la case prévue à cet effet.

Calculer ensuite le rapport poids frais sur poids sec de l'échantillon et l'indiquer sur la fiche de suivi d'échantillon [EB/08/Poisson] dans la case prévue à cet effet.

Reboucher chacun des vials avec leurs bouchons à visser après avoir remplacer le filtre GFC [127] par le septum en téflon d'origine.

Si l'étape d'extraction n'est pas réalisée immédiatement, conserver les échantillons à l'abri de la lumière.

## **Extraction des lipides :**

### Appareils

- [A-090] : Four à micro-ondes
- [A-053]: ASE Dionex 200 composé :
  - ◊ [A053/1] Du module d'extraction muni de deux plateaux, d'un tube de collecte de « waste » dans le compartiment à solvant, ainsi que de quatre tubes collecteurs de rinçage R1 à R4 sur le plateau des tubes de collecte ;

- ◊ [A053/2] Du module « solvant controller » ;
- ◊ Des bouteilles à solvants A,B,C,D ;
- [A-067-D] : Pipettes automatiques Eppendorf de 100-1000µl
- [A-054] : Système d'évaporation-concentration TURBOVAP LV Zymarck
- [A-032] : Lave-vaisselle
- [A-040] : Bain à ultra-sons

### **Petit matériel, verrerie et consommables**

- [xP001-LEAE1] : Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhydre pour analyse ;
- [xP052-LEAE41] : Hexane pour l'analyse des résidus ;
- [xP053-LEAE42] : Dichlorométhane pour l'analyse des résidus
- [xP057-LEAE43] : Méthanol pour l'analyse des résidus ;
- [xP083-LEAE44] : Acétone pour l'analyse des résidus
- Cellules d'extractions pour ASE de capacité 11 mL [xP431-143], 22 mL [xP432-144], 33 mL [xP433-145] ;
- [xP435-146] Instrument d'insertion ;
- [xP485-183] Pince à sertir ;
- [xPXXX-182] Pince d'insertion de joint ;
- Tourie à solvant dédiée « waste » ;
- [xP211-LEAE127] : Filtre en cellulose ;
- [xPXXX-LEAE161] : Tube de récolte 40ml ;
- [xP402-LEAE 162] : Tube de récolte 60ml ;
- [xP215- LEAE 128] : Joint en PEEK ;
- [xP216-LEAE129] : Joint en PTFE ;
- [xP217- LEAE 130] : Frité ;
- [xP500-LEAE 241] : Bouteille de gaz d'N<sub>2</sub> sec qualité N40 ;
- [167] : Tubes à essai
- [xPXXX-LEAE133] : Tips de 1000µl pour pipettes automatiques Eppendorf de 100-1000µl
- [192] : Spatule
- [193] : Spatule
- [282] : Papier M-Tork
- [xP707-LEAE289] : Produit de lavage pour lave-vaisselle concentré RBS 50 PF



## **Méthodes d'extraction**

### **Graisse**

L'extraction du tissu adipeux est réalisée par fonte.

Le tube à essai [167], contenant le tissu adipeux prélevé, préparé au point en 6.3.1 est introduit dans le four à micro-ondes [A090] (Mode d'utilisation [XXX]) après avoir été déposé dans un récipient en plastique de façon à ce qu'il ne puisse pas basculer.

L'échantillon est chauffé pendant environ 1 minute à 650 watts.

Au moyen de la balance de précision AT261 METTLER TOLEDO [024-A] (Mode d'utilisation [XXX]), tarer un nouveau tube à essai [167], imprimer la tare et l'identifier sur le listing de l'imprimante de la balance.

Prélever ensuite environ 650 µl de graisse fondue avec une pipette automatique Eppendorf de 100-1000 µl [A067/X] (Mode d'utilisation [XXX]) munie d'un tips de 1000 µl [xPXXX-LEAE-133] en prenant bien soin de ne pas prélever de résidus solides formés au cours de la fonte de façon à obtenir environ 500mg de graisse.

Au moyen de la balance de précision AT261 METTLER TOLEDO [024-A] (Mode d'utilisation [XXX]), peser à nouveau le tube à essai, imprimer son poids et l'identifier sur le listing de l'imprimante de la balance.

Calculer le poids de lipides de l'échantillon par différence entre le poids et la tare du tube et indiquer le poids de lipides de l'échantillon sur la fiche de suivi d'échantillon [EB/08/Poisson] dans la case prévue à cet effet.

Les tubes à essai et tips utilisés pour l'extraction de la graisse sont à usage unique et sont donc éliminés.

### **Muscle et foie**

#### **Description de la méthode**

L'extraction de muscle et du foie lyophilisés se fait par ASE DIONEX 200 [A-053] (Mode d'utilisation [XXX]). Il s'agit d'une méthode d'extraction à chaud et sous pression élevée de la matière sèche.

Les conditions d'extraction (Méthode LEAE 2) à programmer (Mode d'utilisation [XXX]) pour ces matrices sont les suivantes :

- Temps de chauffage de la cellule : 6 min (pas de préchauffage)
- Température du four : 125°C
- Pression : 1500psi
- Durée du cycle d'extraction : 5 minutes
- Volume de rinçage : 60% du volume de la cellule (paramètre ajusté automatiquement)
- Temps de purge à l'azote [xP500LEAE 241]: 100 secondes
- Solvant : Hexane [xP052-LEAE41]
- Nombre de cycle : 2

**! Remarque importante**

**A nouveau, le poids sec d'échantillon à extraire doit être ajusté suivant la nature du poisson de façon à obtenir une quantité de lipides de 500mg environ. Si la teneur en PCBs présumée est élevée (supérieure à 50ppb par congénère), cette quantité peut également être adaptée.**

**Remplissage des cellules ASE :**

1. en fonction du volume d'échantillon sec à extraire préparé au point 7.3.2 , prendre une cellule d'extraction A.S.E de capacité 11 mL [xP431-143], 22 mL [xP432-144] ou 33 mL [xP433-145] ;
2. positionner la cellule numéro vers le bas et dévisser l'extrémité supérieure ;
3. au moyen d'une pince, prendre un filtre [xP211-LEAE127], le placer à l'entrée de la cellule et l'enfoncer légèrement ;
4. le pousser au fond à l'aide de l'instrument d'insertion [xP435-146];
5. Au moyen de la balance de précision AT261 METTLER TOLEDO [024-A] (Mode d'utilisation [XXX]), tarer la cellule munie de son filtre, imprimer la tare et l'identifier sur le listing de l'imprimante de la balance;
6. Ajouter dans la cellule tarée la quantité nécessaire d'échantillon lyophilisé à extraire obtenu au point 7.3.2 à l'aide d'une spatule [192] ou [193];
7. Au moyen de la balance de précision AT261 METTLER TOLEDO [024-A] (Mode d'utilisation [XXX]), peser à nouveau la cellule, imprimer son poids et l'identifier sur le listing de l'imprimante de la balance;
8. Calculer le poids sec d'échantillon par différence entre le poids et la tare de la cellule et indiquer le poids sec exact d'échantillon extrait sur la fiche de suivi d'échantillon [XXX] dans la case prévue à cet effet.
9. Introduire environ 0.5g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhydre [xP001-LEAE1] dans la cellule ;
10. Ajouter le surrogate N°143 de manière à obtenir une concentration finale de 50pg/μl dans l'extrait et fermer la cellule.

**Chargement des plateaux :**

- Positionner les cellules sur le plateau du dessus, numéro vers le bas;
- Prendre des tubes de récolte de 40ml [xPXXX-LEAE 161] ou des tubes de récolte de 60ml [xP402-LEAE 162], les annoter du numéro de l'échantillon en fonction du volume d'échantillon à extraire et de la capacité de la cellule d'extraction ASE utilisée;
- Au moyen de la balance de précision AT261 METTLER TOLEDO [024-A] (Mode d'utilisation [XXX]), tarer chaque récipient annoté sans son bouchon, imprimer la tare et l'identifier sur le listing de l'imprimante de la balance;
- Positionner les tubes de récoltes tarés sur le plateau du bas. Le nombre de tubes de collecte par échantillon dépend du nombre d'extractions réalisées sur l'échantillon ;
- Vérifier que les quatre tubes de rinçage R1 à R4 soient vides et en place sur le plateau du bas;
- Lancer la procédure d'extraction comme décrit dans le Mode d'utilisation [XXX]

- Dans le cahier "Utilisation de l'ASE " [DB/08/XXX], répertoire, pour chaque échantillon extrait : la date, le numéro de la méthode d'extraction utilisée, le numéro de la cellule (N° gravé sur le cylindre de celle-ci), la position de la cellule et le numéro de l'échantillon correspondant.

### Evaporation de l'extrait :

Après extraction, les tubes de récolte, sont ouverts et leurs bouchons soigneusement identifiés. Ils sont alors transférés dans le TURBOVAP LV Zymarck [A-054] (Mode d'utilisation [XXX]) et évaporés sous flux d'azote [xP500-LEAE 241], à une température de 50°C jusqu'à poids constant.

Les conditions de pression et le temps d'évaporation dépendent du volume du tube de récolte et de son niveau de remplissage. Afin d'éviter les projections de solution, il convient (en particulier si le tube de récolte est rempli à plus de deux tiers de son volume), de commencer l'évaporation à une pression réduite de 5 psi pendant 3 minutes. Lorsqu'un volume d'environ 2/3 du tube est atteint, la pression peut-être graduellement augmentée. On procède généralement suivant la progression suivante :

- 3 à 5 min à 10psi
- 3 à 5 min à 20psi
- 3 à 5 min à 25psi

Lorsque tout le solvant semble être éliminé, évaporer encore 3 minutes à 25psi. Essuyer soigneusement l'extérieur du tube de récolte avec du papier M-Torck [282] et peser à nouveau le tube à la balance de précision AT261 METTLER TOLEDO [024-A] (Mode d'utilisation [XXX]) sans son bouchon.

Introduire le poids obtenu dans le programme Excel [DB/08/poisson ] (Instruction [IB/08/Poisson]).

Répéter l'opération jusqu'à ce que la variation de poids par rapport à la pesée précédente soit inférieure à 1.1 % et que le programme indique "OK" (et non plus "non sec") dans la dernière colonne du tableau. Imprimer le tableau et le coller dans le cahier de laboratoire personnel du technicien dans lequel celui-ci relate en détails quotidiennement toutes ses activités.

Calculer le poids de lipides de l'échantillon par différence entre le poids obtenu et la tare du tube de récolte et indiquer le poids exact de lipides d'échantillon extraits sur la fiche de suivi d'échantillon [EB/08/Poisson] dans la case prévue à cet effet.

Calculer ensuite le rapport poids sec sur poids de lipides de l'échantillon et l'indiquer sur la fiche de suivi d'échantillon [EB/08/Poisson] dans la case prévue à cet effet.

### Nettoyage du matériel d'extraction ASE

- Démontez et vider les cellules
- Laver les cylindres au lave-vaisselle [A-032] avec du nettoyant RBS [xP707-LEAE-289]
- Rincer les cylindres lavés ainsi que toutes les autres pièces des cellules (joints, bouchons à visser...) à l'exception des frittés, successivement dans les bains de solvants suivants :
  1. Acétone pour l'analyse des résidus [xP083-LEAE44]
  2. Méthanol pour l'analyse des résidus [xP057-LEAE43]
  3. Dichlorométhane pour l'analyse des résidus [xP053-LEAE42]
  4. Hexane pour l'analyse des résidus [xP052-LEAE41]
- Rincer séparément les frittés en les plongeant successivement dans des bains de chacun des ces 4 solvants et en plaçant chaque bain pendant 5 minutes à l'ultra-sons [XXX]

- Disposer, *sous hotte*, sur du papier M-Tork [282], les différentes pièces des cellules d'extraction ASE ainsi lavées
- Après environ une heure, quand toutes les pièces sont bien sèches, les cellules sont réassemblées puis rangées dans une armoire dédiée à cet usage.

## **Purification de l'extrait et extraction des PCBs**

### **Appareils**

- [A-064] : Dispositif d'évaporation Visidry SUPELCO-24 places
- [A-065] : Dispositif de purification Visiprep SPE SUPELCO- 24 places
- [A-011] : Vibramax 110 HEIDOLPH
- [A-066/E] : Pipettes automatiques Eppendorf de 500-5000 µl
- [A-066/L] : Pipettes automatiques Eppendorf de 20-200 µl
- [A-089] : Pipettes automatiques Finnpiquette Labsystems de 10ml
- [A-056] : Centrifugeuse réfrigérée JOUAN-Vel
- [A-066/B] : Pipettes automatiques Eppendorf de 10-100 µl

### **Petit matériel, verrerie et consommables**

- [149] : Dispensette graduée de 10ml sur flacon en verre ambré de 250 ml
- [241] : N<sub>2</sub>
- [167] : Tubes à essais
- [148] : Valves de contrôle du flux pour Dispositif de purification Visiprep™ SPE SUPELCO
- [124] : Liners d'écoulement pour Dispositif de purification Visiprep™ SPE SUPELCO
- [XXX] : Solution de congénères 112 (surrogate) à 10ng/µl dans l'isooctane
- [XXX] : Solution de congénères 30 (surrogate) à 10ng/µl dans l'isooctane
- [41] : Hexane pour HPLC, GC, analyse des résidus de pesticides et spectrométrie de masse (Burdick et Jackson Brand)
- [44] : Acétone pour HPLC, GC, analyse des résidus de pesticides et spectrométrie de masse (Burdick et Jackson Brand)
- [82] : Acide sulfurique fumant 30% SO<sub>3</sub> (MERCK)
- [81] : Acide sulfurique min 95% (Vel)
- [121] : Microcolonne Florisil 1 gr (SUPELCO Superclean™ ENVI Florisil SPE 6 ml)
- [C-125] : Aiguille TERUMO Neolus 21G 0.8 mm
- [166] : Vial EPA ambré de 20 ml
- [131] : Tips Eppendorf de 100 µl
- [132] : Tips Eppendorf de 300 µl
- [135] : Tips Eppendorf de 10 ml
- [150] : Eprouvette graduée de 200 ml
- [xP701-283] : Gants en latex Médium
- [xP709-287] : Lunettes de sécurité
- [xP450-184] : Erlenmeyer rôdé B29 de 100ml
- [xP442-185] : Bouchon rôdé B29
- [xPXXX-161] : Tube de collecte ASE de 40 ml
- [xP402-162] : Tube de collecte ASE de 60 ml

## Préparation des solutions

### Préparation des solutions de surrogate

Le surrogate permet de quantifier les éventuelles pertes qui se produiraient lors des différentes étapes de purification et d'extraction des PCBs. Il est ajouté avant l'extraction directement au matériel à analyser. Le volume ajouté est calculé de manière à obtenir une concentration de 50pg/μl dans l'extrait final.

Le choix du surrogate est basé sur sa résistance aux différentes étapes d'extraction et de purification, son absence dans les échantillons à analyser, et le fait qu'il n'interfère avec aucune autre molécule lors de l'injection. Les congénères de PCBs 30 (2,4,6-trichlorobiphényle) et 112 (2,3,3',5,6-pentachlorobiphényle) répondent à ces différents critères.

La solution est préparée de la façon suivante :

- A l'aide d'une pipette automatique Eppendorf de 100 μl [A-066/B] (Mode d'utilisation [XXX]) munie d'un tips de 300 μl [C-132], prélever 100 μl de la solution de congénère 30 à 10ng/μl dans l'isooctane [XXX]
- Dispenser la solution prélevée dans un vial EPA de 20 ml [C-166]
- A l'aide d'une pipette automatique Eppendorf de 100 μl [A-066/B] (Mode d'utilisation [XXX]) munie d'un tips de 300 μl [C-132], prélever 100 μl de la solution de congénère 112 à 10ng/μl dans l'isooctane [XXX]
- Dispenser la solution prélevée dans le vial EPA de 20 ml [C-166] contenant déjà la solution de congénère 30
- Ajouter ensuite 9,8 ml d'hexane [C-041] à l'aide d'une pipette automatique Finnpiquette de 10 ml [A-089] (Mode d'utilisation [XXX]) munie d'un tips de 10 ml [C-135]
- Indiquer sur le flacon la nature de la solution, son N° de lot (N° de lot = date à l'envers AA/MM/JJ) ainsi que la date de péremption de la solution (Durée de validité : 1 mois)
- Dans le cahier "Solutions standards" [DB/08/XXX], répertorier la solution préparée.
- Refermer soigneusement le vial, homogénéiser la solution et conserver au congélateur dédié à cet usage.

*! Lors des différents prélèvements le vial ne doit rester ouvert que le temps strictement nécessaire au prélèvement de la solution. Il faut donc bien veiller à le refermer soigneusement après chaque prélèvement et à le replacer au congélateur après chaque utilisation. Il faut également bien veiller à utiliser un tips propre, remplacé à chaque prélèvement.*

### Préparation de la solution d'acide sulfurique

! Avant de commencer la préparation de la solution d'acide, se munir de gants en latex Médium [xP701-283] et de lunettes de sécurité [xP709-287].

- **Travailler sous hotte !**
- Dans une éprouvette graduée de 200 ml [150], verser 50 ml d'acide sulfurique fumant 30% SO<sub>3</sub> (MERCK) [82] et 150ml d'acide sulfurique min 95% (Vel) [81].
- Verser ce mélange dans un flacon en verre ambré avec dispensette graduée de 10ml [149], dédié à cette usage et portant une étiquette identifiant la nature de la solution qu'il contient.

- Revisser la dispensette sur le flacon
- Indiquer sur le flacon la date de préparation de la solution et sa date de péremption (Validité : 3 mois).

#### Préparation du mélange hexane /acétone 1:1 (V/V)

- Dans un erlenmeyer rôdé B29 de 100ml [xP450-184] dédié à cette usage et portant une étiquette identifiant la nature de la solution qu'il contient, verser de l'acétone pour HPLC, GC, analyse des résidus de pesticides et spectrométrie de masse (Burdick et Jackson Brand) [44] jusqu'à la graduation 50 ml
- Verser ensuite de l'hexane pour HPLC, GC, analyse des résidus de pesticides et spectrométrie de masse (Burdick et Jackson Brand) [41] jusqu'à la graduation 100 ml
- Refermer le récipient avec un bouchon rôdé B29 [xP442-185] et homogénéiser la solution

La solution doit être fraîchement préparée et est renouvelée lors de chaque séquence d'analyse, dans le même erlenmeyer, préalablement rincé aux deux solvants.

### **Reprise des extraits à purifier**

#### Reprise des échantillon de graisse fondue

Après avoir enregistré sur la fiche de suivi de l'échantillon [EB/08/Poisson] le poids exact (à  $10^{-5}$ gr) de lipides à purifier, on ajoute directement dans le tube à essai [167] (obtenu en 8.3.1) à l'aide d'une micropipette automatique Eppendorf de 200µl [A-066/L] (Mode d'Utilisation [XXX]) 125µl d'une solution à 100pg/µl en PCBs 30 et 112 (surrogate) dont la préparation est décrite au point 9.3.1.

On ajoute alors à l'aide d'une micropipette automatique Eppendorf de 5 ml [A-066/E] (Mode d'Utilisation [XXX]) 3 ml d'hexane [41] et l'échantillon est homogénéisé par agitation au Vibramax 110 HEIDOLPH [A-011] (Mode d'Utilisation [XXX]) pendant 2 minutes.

#### Reprise des échantillons de lipides extraits à l'ASE (Foie et muscle)

Après avoir enregistré sur la fiche de suivi de l'échantillon [EB/08/Poisson] le poids exact (à  $10^{-5}$ gr) de lipides à purifier, on ajoute directement dans le vial de récolte ASE ([xPXXX-161] ou [xP402-162]) (obtenu en 8.3.2) à l'aide d'une micropipette automatique Eppendorf de 200µl [A-066/L] (Mode d'Utilisation [XXX]) 125µl d'une solution à 100pg/µl en PCB 30 et 112 (surrogate) préparée comme expliqué au point 9.3.1.

On ajoute alors à l'aide d'une micropipette automatique Eppendorf de 5 ml [A-066/E] (Mode d'Utilisation [XXX]) 2 ml d'hexane [41] et l'échantillon est homogénéisé par agitation manuelle puis transféré dans un tube à essai [167] portant le numéro de l'échantillon. Le vial de récolte ASE ([xPXXX-161] ou [xP402-162]) est ensuite rincé avec 1 ml d'hexane [41] supplémentaire qui est versé à son tour dans le tube à essai.

L'échantillon est ensuite homogénéisé par agitation au Vibramax 110 HEIDOLPH [A-011] (Mode d'Utilisation [XXX]) pendant 2 minutes.



## Clean-up acide

Cette étape de purification est destinée à éliminer les matières organiques – comme les lipides, les lipoprotéines, les glucides... - qui ont été extraites en même temps que les micropolluants (JENSEN *et al*; 1972).

Dans le tube à essai contenant l'extrait en solution hexanique obtenue en 9.4, on ajoute à l'aide de la dispensette [149] (Mode d'Utilisation [XXX]), 2ml d'un mélange d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> fumant à 30% et d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré (1/3;V/V) dont la préparation est décrite au point 9.3.2.

Le mélange est agité pendant 2 minutes au Vibramax 110 HEIDOLPH [A-011] (Mode d'Utilisation [XXX]) puis centrifugé pendant 3 minutes à 3000 tours/min à une température de 10°C (1750g) avec une centrifugeuse Centrifugeuse réfrigérée JOUAN (Vel) [A-056] (Mode d'Utilisation [XXX]).

Le surnageant (phase organique) est délicatement prélevé avec une micropipette automatique Eppendorf de 5 ml [A-066/E] (Mode d'Utilisation [XXX]) (*en changeant de tips pour chaque échantillon!*) et transféré dans un nouveau tube à essai portant le numéro de l'échantillon.

3 ml d'hexane sont à nouveau ajoutés à l'acide sulfurique décanté avec une micropipette automatique Eppendorf de 5 ml [A-066/E] (Mode d'Utilisation [XXX]), les étapes d'agitation, de centrifugation et de récupération du surnageant sont répétées.

Les surnageants sont rassemblés dans le tube à essai et concentrés, sous flux d'azote à un volume de 1ml environ à l'aide du dispositif d'évaporation Visidry SUPELCO [A-064] (Mode d'Utilisation [XXX]) muni d'aiguilles TERUMO Neolus 21G 0.8 mm [C-125].

## Clean-up Florisil

Cette étape de purification est destinée à éliminer la plupart des molécules polaires susceptibles d'être présentes dans l'extrait et qui pourraient interférer avec les molécules de organochlorées lors de l'analyse en chromatographie gazeuse à haute résolution (MILLS *et al.*, 1972).

Des microcolonnes contenant 1 gr de Florisil (SUPELCO Superclean™ ENVI Florisil SPE Tubes 6 ml) [121] sont placées sur le dispositif de purification Visiprep SPE SUPELCO [A-065] (Mode d'Utilisation [XXX]) préalablement muni de valves de contrôle du flux [148] et de liners d'écoulement [124].

Les microcolonnes sont ensuite conditionnées à l'aide de solvants de moins en moins polaires. pour ce faire, on les élue successivement avec 5ml d'acétone [44], 5ml du mélange hexane /acétone 1:1 (V/V) dont la préparation est décrite au point 9.3.3 et 12 ml d'hexane [41]. Les solvants ayant servi au conditionnement sont éliminés.

Après avoir placé dans le dispositif purification Visiprep SPE SUPELCO [A-065] des tubes de récoltes de l'éluat (tubes à essai [167]) portant le numéro de l'échantillon, l'extrait préalablement amené à un volume de 1 ml obtenu au point 9.5 est déposé en tête de colonne et élué avec 2x3 ml d'hexane [41] prélevés avec une micropipette automatique Eppendorf de 5 ml [A-066/E] (Mode d'Utilisation [XXX]). Les 3 premiers ml sont utilisés pour rincer le tube à essai ayant contenu l'extrait.

### **! Remarques importantes**

- Il est important de bien veiller à ce que les tiges des liners d'écoulement [124] plongent bien dans les tubes à essai de récolte de l'éluat **AVANT** de procéder à l'élution de l'échantillon.

- Lors du conditionnement et jusqu'à la fin de l'élution de l'échantillon, les colonnes ne doivent jamais aller à sec.

L'éluat est alors amené **juste à sec** sous flux d'azote à l'aide du dispositif d'évaporation Visidry SUPELCO [A-064] (Mode d'Utilisation [XXX]) muni d'aiguilles TERUMO Neolus 21G 0.8 mm [C-125].

L'échantillon est ensuite **IMMEDIATEMENT** repris comme décrit au point 10.4.

## **Préparation de l'extrait à analyser**

### **Appareils**

- [A-087] : Pince à sertir fiole à injection de 2 ml
- [A-066-C] : Pipettes automatiques Eppendorf de 200 µl
- [A-089] : Pipettes automatiques Finnpiquette de 10 ml

### **Petit matériel, verrerie et consommables**

- [XXX] : Solution de Mirex à 10ng/µl dans l'isooctane
- [C-041] : Hexane pour HPLC, GC, analyse des résidus de pesticides et spectrométrie de masse (Burdick et Jackson Brand)
- [XXX] : Fiole pour injection de 2 ml
- [XXX] : Insert de 150µl pour fiole à injection de 2 ml
- [XXX] : Bouchon à sertir muni d'un septum pour fiole à injection de 2 ml
- [C-132] : Tips de 300 µl pour pipettes automatiques Eppendorf de 10-200 µl
- [C-135] : Tips de 10 ml pour pipettes automatiques Finnpiquette de 10ml
- [C-166] : Vials EPA 20ml

## **Préparation de la solution de standard interne**

Le standard interne est ajouté à l'extrait juste avant l'injection. Le volume ajouté est calculé de manière à obtenir une concentration de 50pg/µl dans l'extrait final.

Il permet de vérifier la qualité de l'injection et de l'analyse chromatographique de l'échantillon. Le Mirex est un pesticide organochloré qui présente l'avantage de ne pas interférer avec d'autres molécules lors de l'analyse par GC/ECD.

La solution est préparée de la façon suivante :

- A l'aide d'une pipette automatique Eppendorf de 200 µl [A-066-C] (Mode d'utilisation [XXX]) munie d'un tips de 300 µl [C-132], prélever 100 µl de la solution de Mirex à 10ng/µl dans l'isooctane [XXX]
- Dispenser la solution prélevée dans un vial EPA de 20 ml [C-166]
- Ajouter 9,9 ml d'hexane [C-041] à l'aide d'une pipette automatique Finnpiquette de 10 ml [A-089] (Mode d'utilisation [XXX]) munie d'un tips de 10 ml [C-135]
- Indiquer sur le flacon la nature de la solution, son N° de lot (N° de lot = date à l'envers AA/MM/JJ) ainsi que la date de péremption de la solution (Durée de validité : 1 mois)
- Dans le cahier "Solutions standards" [DB/08/XXX], répertorier la solution préparée.
- Refermer soigneusement le vial, homogénéiser la solution et conserver au congélateur dédié à cet usage.



*! Lors des différents prélèvements le vial ne doit rester ouvert que le temps strictement nécessaire au prélèvement de la solution. Il faut donc bien veiller à le refermer soigneusement après chaque prélèvement et à le replacer au congélateur après chaque utilisation. Il faut également bien veiller à utiliser un tips propre, remplacé à chaque prélèvement.*

### **Conditionnement de l'extrait à injecter en GC/ECD**

Dès la disparition de la dernière goutte de solvant au point 9.10, on ajoute dans chaque tube à essai contenant les échantillons, à l'aide d'une micropipette automatique Eppendorf de 200µl [A-066-C] (Mode d'Utilisation [XXX]) successivement (avec des tips différents de 300 µl [C-132]), 125µl d'hexane et 125µl de la solution hexanique de Mirex à 100pg/µl dont la préparation est décrite en 10.3.

Ensuite, avec la même pipette, et ***en changeant de tips pour chaque échantillon***. Les parois de chaque tube sont rincées avec la solution et celle-ci est homogénéisée en la prélevant et rééjectant à plusieurs reprises.

140 µl de l'extrait à injecter sont alors prélevés à l'aide d'une pipette automatique Eppendorf de 200 µl [A-066-C] (Mode d'utilisation [XXX]) munie d'un tips de 300 µl [C-132], et transférés dans l'insert de 150µl [XXX] d'une fiole pour injection de 2ml [XXX] portant le numéro de l'échantillon.

Le récipient est alors hermétiquement scellé avec un bouchon muni d'un septum [XXX] à l'aide de la pince à sertir [A-087]. Il ne doit pas être possible de faire tourner manuellement le bouchon (si c'est le cas, il faut le resserrer avec la pince pour éviter toute concentration de l'échantillon).

Le volume restant de l'extrait à injecter est transféré dans une fiole pour injection de 2ml [XXX] portant également le numéro de l'échantillon mais non munie d'un insert et la fiole est conservée au congélateur.

Le N° de lot de la solution de Mirex utilisée est indiqué sur la fiche de suivi d'échantillon [EB/08/Poisson] dans la case prévue à cet effet.

### ***! Remarques importantes***

***Les différents volumes, concentrations et quantités d'échantillon mentionnées dans ce mode opératoire décrivent les conditions permettant d'atteindre une limite de quantification de 5 ppb par rapport à la graisse (ng de congénère PCB/g de lipides).***

S'il s'avère que l'échantillon contient une quantité de PCBs supérieure à 50 ppb par congénère (ce qui correspond, dans les conditions décrites dans ce mode opératoire, à une concentration supérieure à environ 100pg/µl dans l'extrait final). Il convient évidemment d'adapter le volume de reprise de l'extrait final en fonction (dilution).

***Une alternative peut-être d'adapter la prise d'échantillon comme il en est fait mention au point 6 de ce mode opératoire.***

### **Contrôle et Assurance Qualité :**

*Elle est assurée par différents systèmes mis en œuvre. Notamment par :*

- *les différents contrôles réalisés sur les appareils, et donc les références aux instructions sont citées dans les modes d'utilisation de ces derniers,*

- l'implémentation de Contrôle Qualité via contrôle du solvant à blanc, du blanc de procédure et le contrôle d'échantillons QC, [IB/08/15-G],

## **Enregistrement relatifs Qualité :**

### ***A adapter***

*L'enregistrement Qualité se fait à différents niveaux :*

*Les Procédures [PB/08/01-02] ainsi que de l'instruction [IB/08/11] décrivent les enregistrements effectués ;*

*L'enregistrement qualité des Procédures [PB/08/225-226-229] s'effectue sur la fiche d'enregistrement qualité [EB/08/220] (d'autres types d'enregistrement telles que les « control charts » sont réalisées et explicitées dans les documents attenants à la procédures [PB/08/229];*

*Il s'effectue également au niveau des appareillages et des étapes via les cahiers d'enregistrement mis en place et cités dans les Modes Opératoires.*

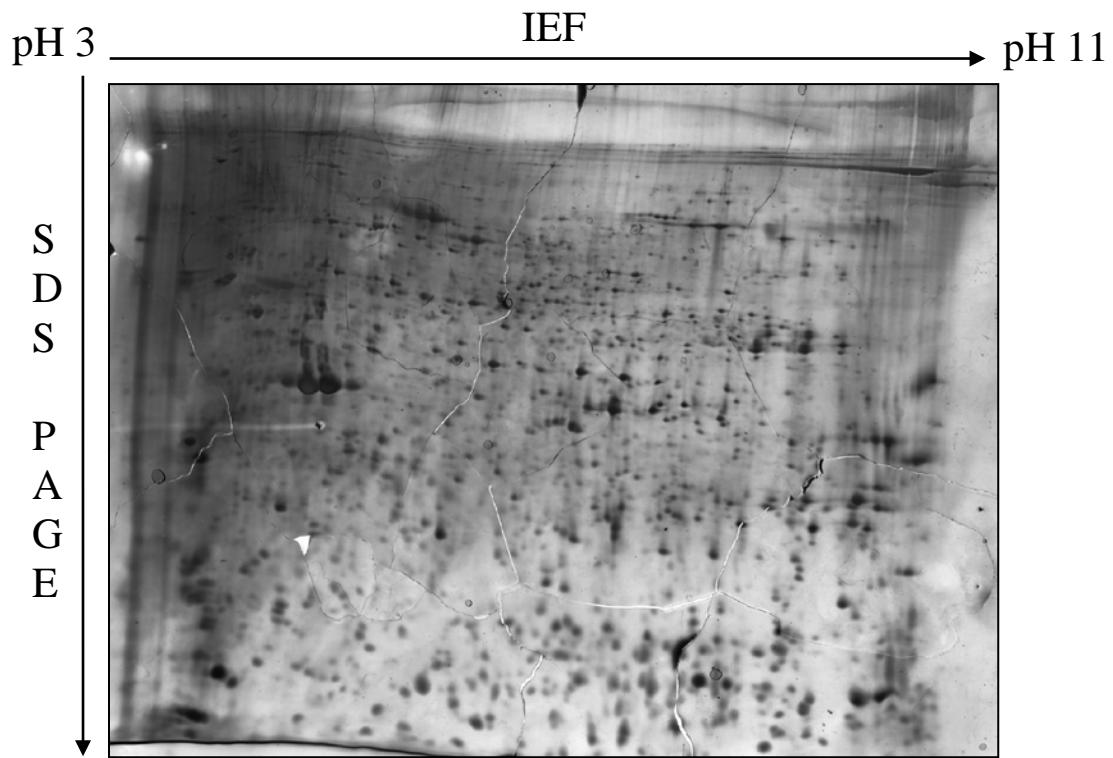
## **Responsabilité :**

### ***A adapter***

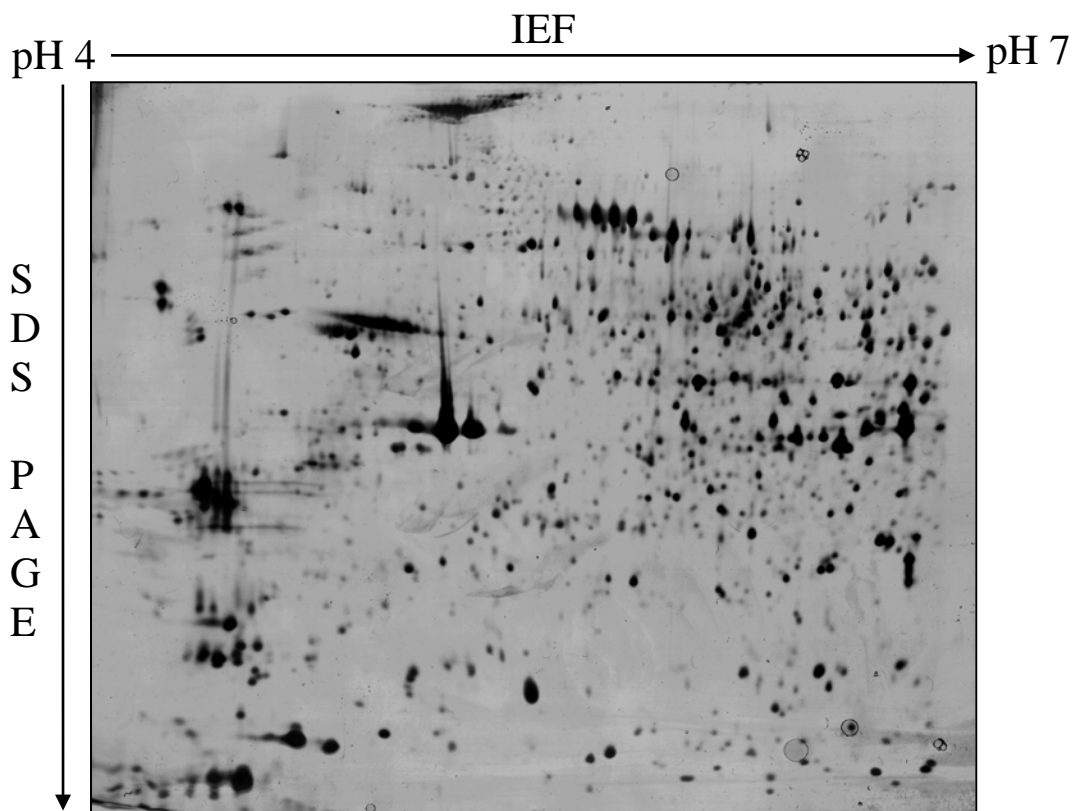
*Le Responsable de la bonne exécution de cette procédure est le RT cité dans le Manuel Qualité et sur le Document de Responsabilité [DB/03/10]. Toutefois, chaque étape possède son Responsable de Domaine qui a pouvoir de décision comme décrit dans les procédures et instructions visées et citées dans le logigramme (cf. 4). Ceux-ci sont repris dans le document « Responsabilités » [DB/03/10].*

*Les autres opérateurs sont autorisés ou retraits à l'exercice des différents Modes Opératoires toujours selon le document « Responsabilités » [DB/03/10].*

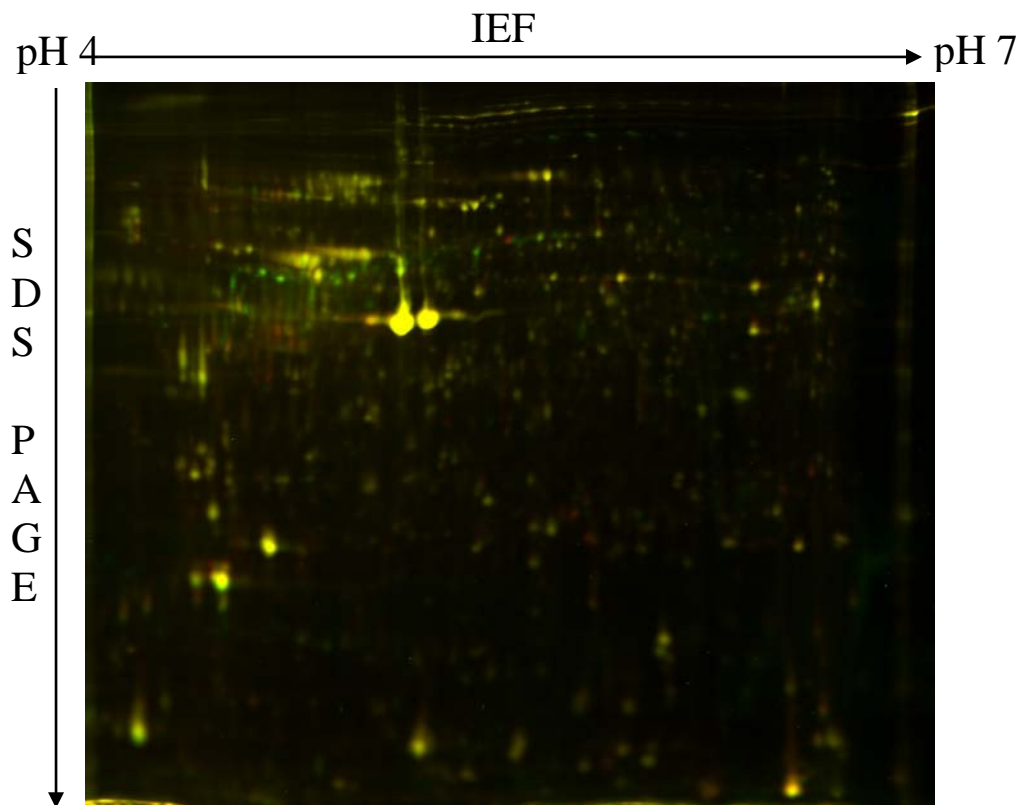
---



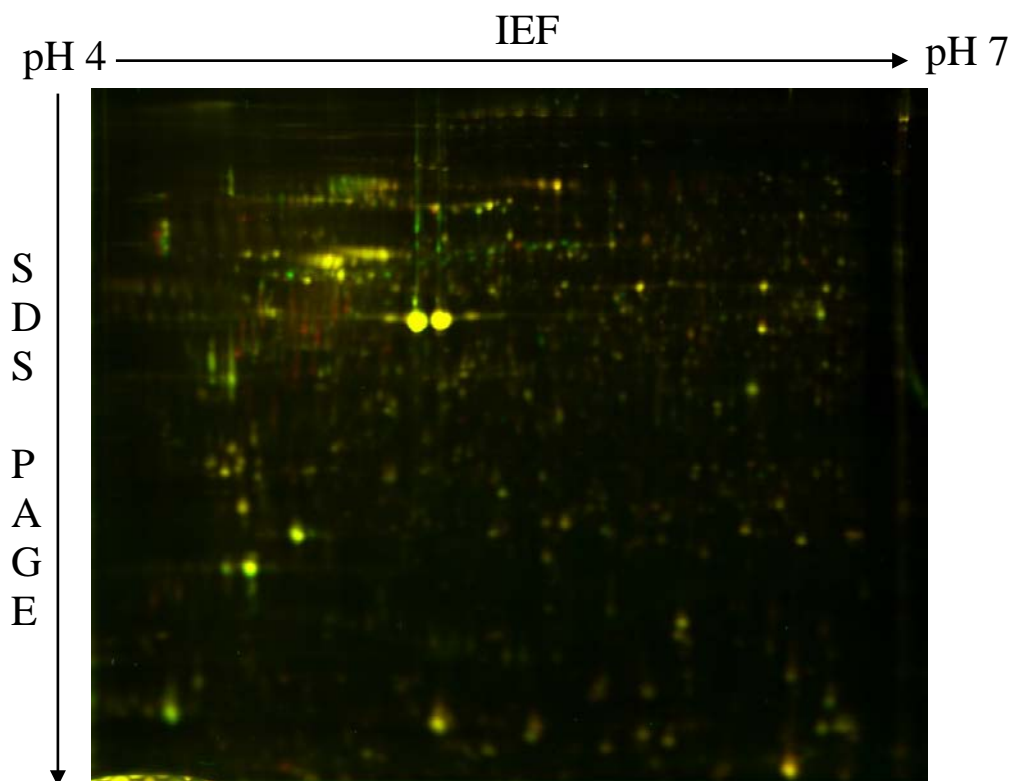
**Figure III.9 :** Photo représentant un gel bidimensionnel coloré à l'argent scanné au moyen du logiciel ImageMaster™ 2D. Ce gel est un gel d'essai dont la gamme de pH s'étend de 3 à 11. Les échantillons de ce gel proviennent de cerveaux de têtards arrivés au stade 54-55, issus d'une manipulation d'essai réalisée en novembre 2006.



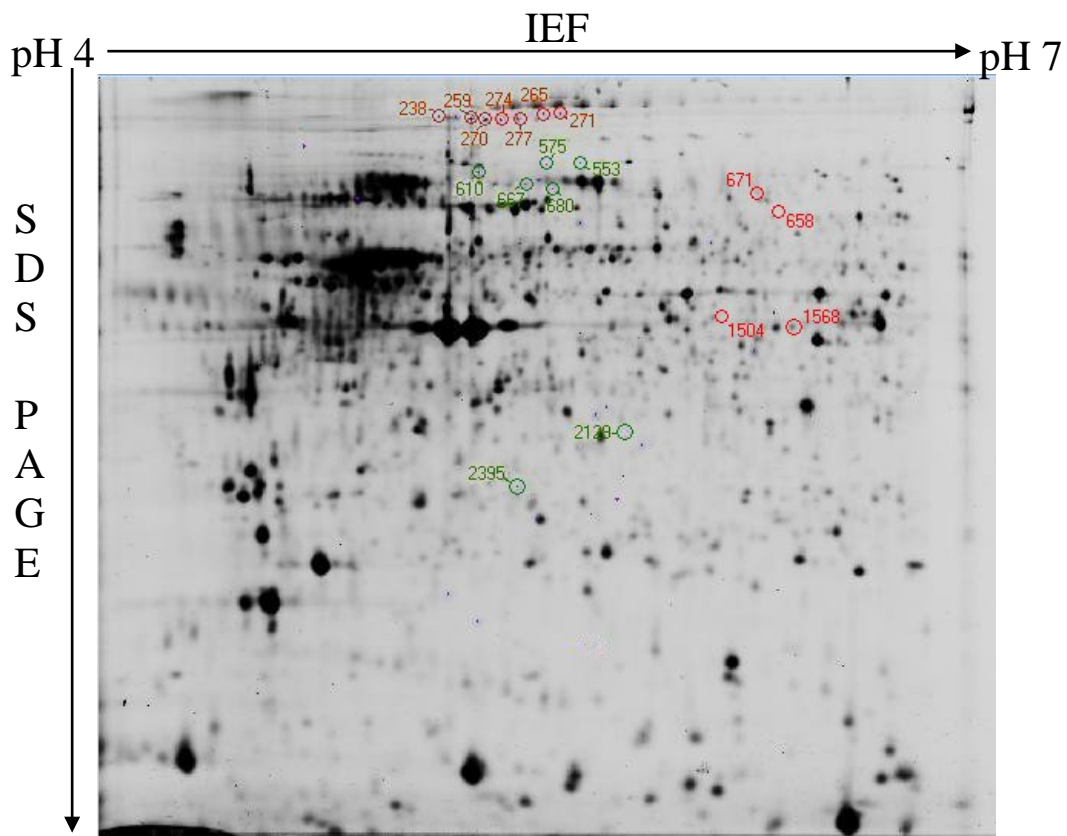
**Figure III.10 :** Photo représentant un gel bidimensionnel coloré à l'argent scanné au moyen du logiciel ImageMaster™ 2D. Ce gel est un gel d'essai dont la gamme de pH s'étend de 4 à 7. Les échantillons de ce gel proviennent de cerveaux de grenouilles prélevées juste après le climax métamorphique, issues d'une manipulation d'essai réalisée en novembre 2006.



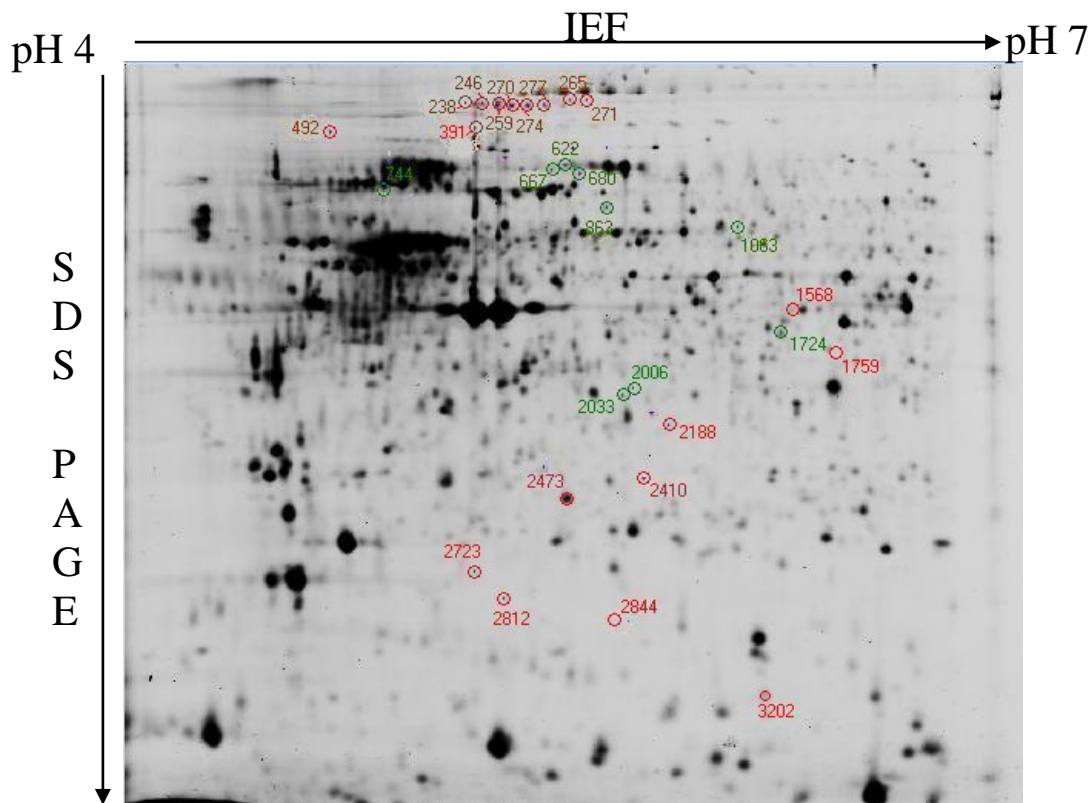
**Figure III.11 :** Photo représentant un gel bidimensionnel DIGE scanné au moyen du scanner Typhoon 9400 aux longueurs d'onde spécifiques des cyanines. La gamme de pH s'étend de 4 à 7 et les échantillons proviennent de cerveaux de têtards prélevés au stade 54-55 de la métamorphose. Les conditions comparées sont le contrôle DMSO vs 10 ppb PCBs.



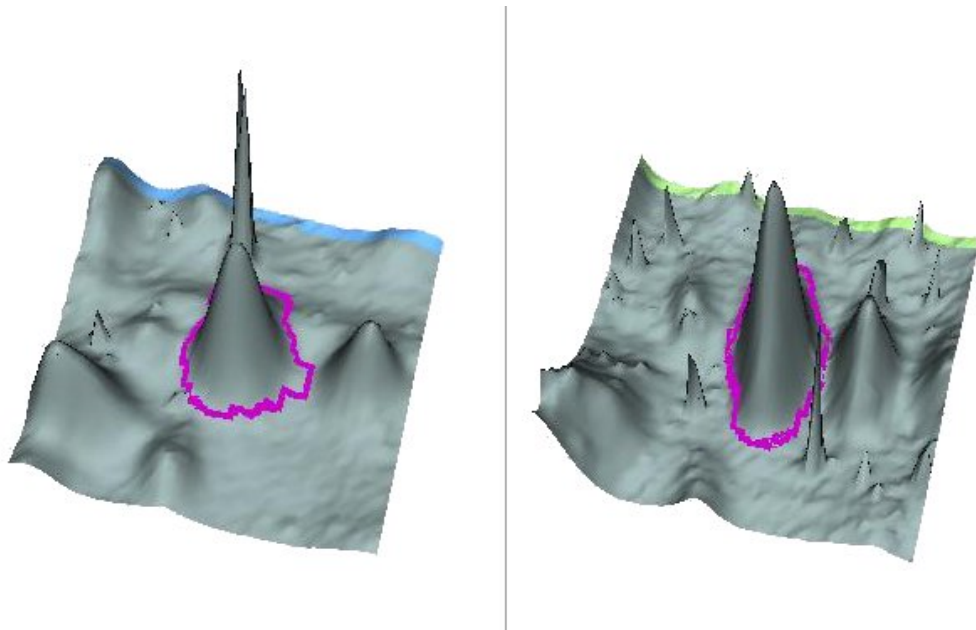
**Figure III.12 :** Photo représentant un gel bidimensionnel DIGE scanné au moyen du scanner Typhoon 9400 aux longueurs d'onde spécifiques des cyanines. La gamme de pH s'étend de 4 à 7 et les échantillons proviennent de cerveaux de têtards prélevés au stade 54-55 de la métamorphose. Les conditions comparées sont le contrôle 1 ppb vs 10 ppb PCBs.



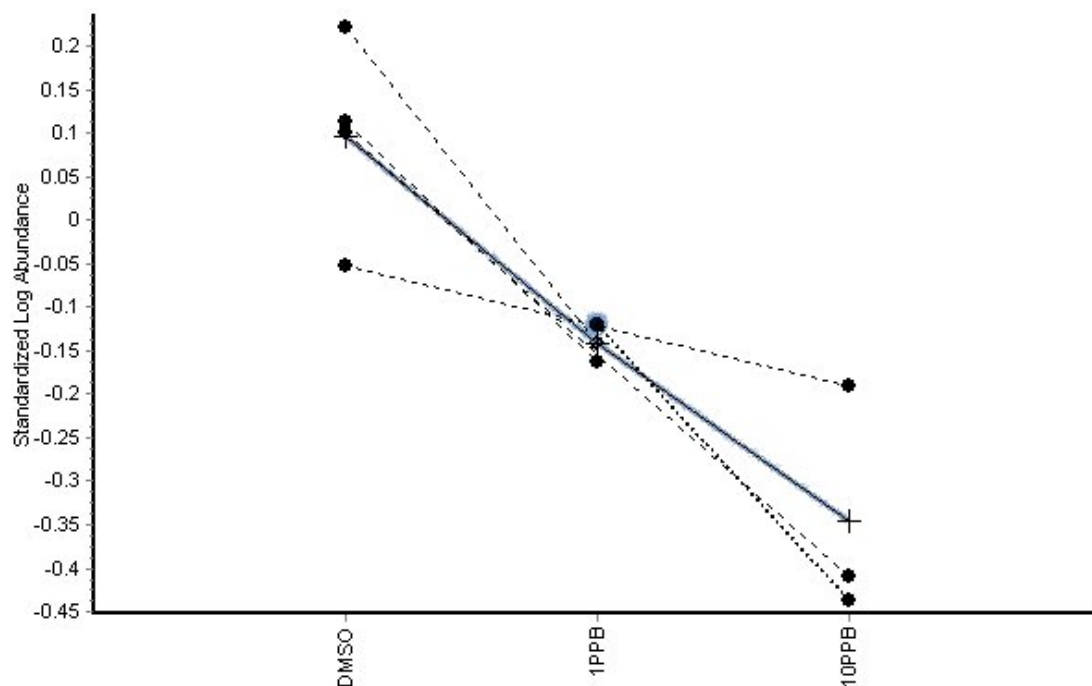
**Figure III.13 :** Photo représentant un gel bidimensionnel DIGE (pH 4-7 ; 12,5 %) de la condition 1 ppb de PCBs. Les échantillons proviennent de cerveaux de têtards prélevés au stade 54-55 de la métamorphose. Les spots d'intérêt ( $p < 0,05$ ) sont entourés en rouge si ils sont sous-exprimés et en vert si ils sont sur-exprimés.



**Figure III.14 :** Photo représentant un gel bidimensionnel DIGE (pH 4-7 ; 12,5 %) de la condition 10 ppb de PCBs. Les échantillons proviennent de cerveaux de têtards prélevés au stade 54-55 de la métamorphose. Les spots d'intérêt ( $p < 0,05$ ) sont entourés en rouge si ils sont sous-exprimés et en vert si ils sont sur-exprimés.



**Figure III.15 :** Représentations 3D de la variation d'expression des protéines. Il s'agit du spot n°1568 qui diminue de 2 fois dans la condition 10 ppb de PCBs (à gauche) par rapport à la condition DMSO (à droite).



**Figure III.16 :** Cette figure représente l'évolution de la variation d'expression du spot n°1568 à travers les 4 gels (les 4 lignes en pointillés) dans la condition contrôle, 1 ppb et 10 ppb de PCBs. La ligne bleue représente la moyenne des 6 gels. *Standardized Log Abundance* = logarithme de l'abondance standardisée.



**Tableau III.4 :** Tableau représentant la liste des spots dont l'expression varie de manière significative suite à une exposition à 1 ppb d'Aroclor 1254 durant 19 jours de des têtards de *Xenopus laevis*.

Position	Master No	Appearance	T-test	Av. Ratio
<b>1</b>	<b>238</b>	<b>15(18)</b>	<b>0,0083</b>	<b>-1,39</b>
2	259	18(18)	0,023	-1,24
3	265	18(18)	0,031	-1,37
<b>4</b>	<b>270</b>	<b>18(18)</b>	<b>0,0041</b>	<b>-1,32</b>
5	271	18(18)	0,033	-1,33
<b>6</b>	<b>274</b>	<b>18(18)</b>	<b>0,0046</b>	<b>-1,29</b>
7	277	18(18)	0,013	-1,21
8	553	18(18)	0,043	1,32
<b>9</b>	<b>575</b>	<b>18(18)</b>	<b>0,0054</b>	<b>1,86</b>
10	610	18(18)	0,012	1,63
11	667	18(18)	0,037	1,62
12	671	18(18)	0,044	-1,78
13	680	18(18)	0,050	1,97
14	1504	15(18)	0,044	-1,24
<b>15</b>	<b>1568</b>	<b>18(18)</b>	<b>0,0052</b>	<b>-1,81</b>
16	2129	18(18)	0,044	1,32
17	2395	18(18)	0,045	1,52
18	658	18(18)	0,017	-2,47

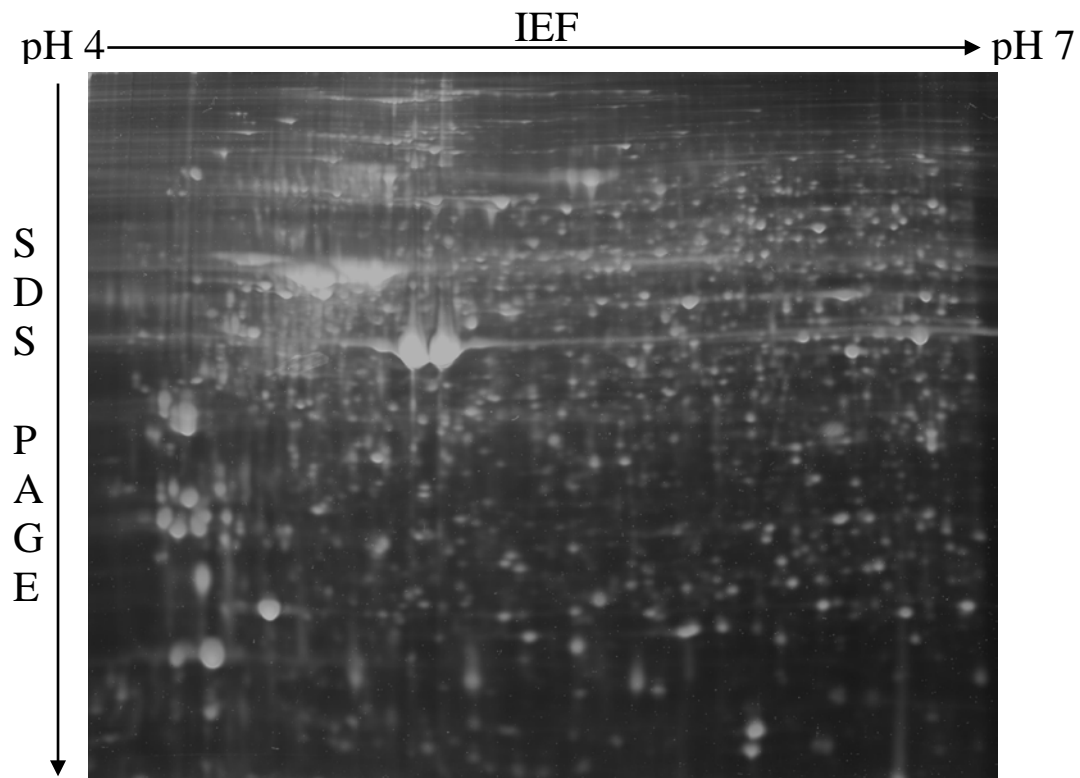
*Master No* : nombre attribué à chaque spot. *Appearance* : nombre de gels pour lesquels le spot en question est présent par rapport au nombre total de gels comparés (entre parenthèses). *T-test* : valeur de t-student. *Average ratio* : facteur de variation d'abondance dans la condition traitée (1 ppb PCBs) par rapport à la condition contrôle (DMSO). Les spots colorés en rouge sont ceux qui varient de manière hautement significative entre les deux conditions (T-test < 0,01).

**Tableau III.5 :** Tableau représentant la liste des spots dont l'expression varie de manière significative suite à une exposition à 10 ppb d'Aroclor 1254 durant 19 jours de des têtards de *Xenopus laevis*.

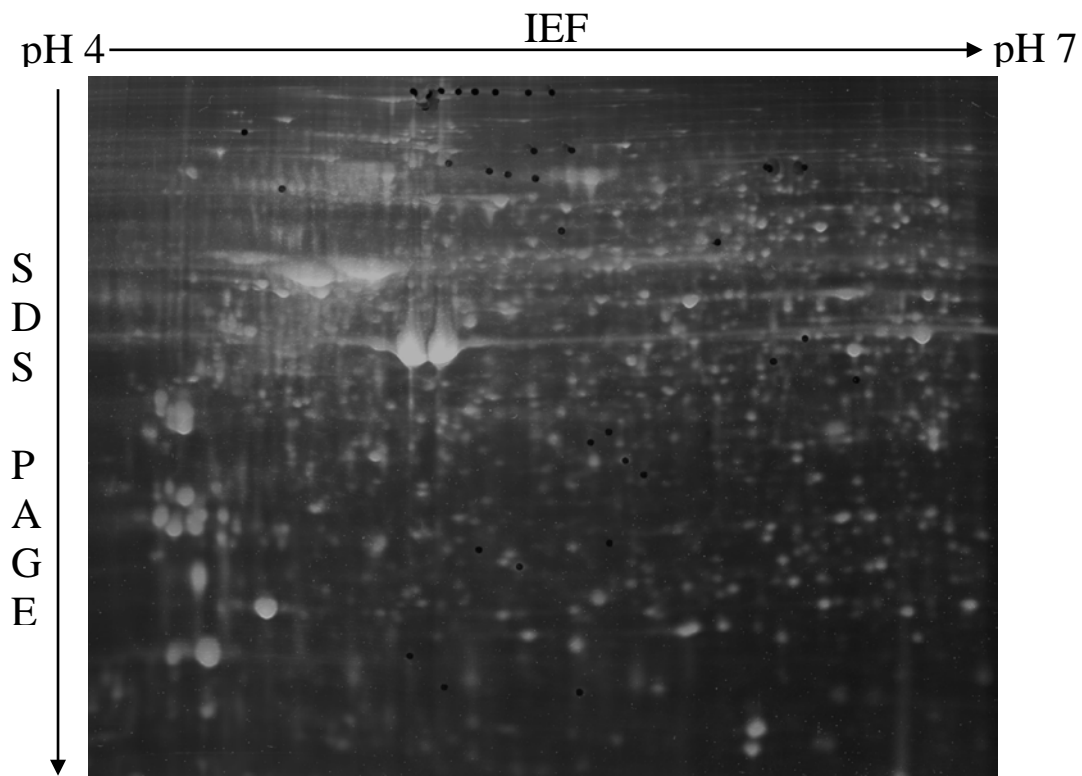
Position	Master No	Appearance	T-test	Av. Ratio
1	238	15(18)	0,018	-1,46
2	246	18(18)	0,013	-1,63
3	259	18(18)	0,015	-1,59
4	265	18(18)	0,028	-1,58
<b>5</b>	<b>270</b>	<b>18(18)</b>	<b>0,0044</b>	<b>-1,79</b>
6	271	18(18)	0,034	-1,40
<b>7</b>	<b>274</b>	<b>18(18)</b>	<b>0,0056</b>	<b>-1,76</b>
<b>8</b>	<b>277</b>	<b>18(18)</b>	<b>0,010</b>	<b>-1,60</b>
9	391	18(18)	0,031	-1,75
10	492	18(18)	0,018	-1,35
11	622	18(18)	0,022	1,55
<b>12</b>	<b>667</b>	<b>18(18)</b>	<b>0,0021</b>	<b>1,37</b>
13	680	18(18)	0,030	2,01
<b>14</b>	<b>744</b>	<b>18(18)</b>	<b>0,0006</b>	<b>1,50</b>
15	863	18(18)	0,031	1,37
16	1063	15(18)	0,049	1,31
17	1568	18(18)	0,040	-2,00
18	1724	15(18)	0,014	1,63
<b>19</b>	<b>1759</b>	<b>15(18)</b>	<b>0,0012</b>	<b>-1,40</b>
20	2006	18(18)	0,022	1,48
<b>21</b>	<b>2033</b>	<b>18(18)</b>	<b>0,010</b>	<b>1,22</b>
22	2188	18(18)	0,022	-1,34
23	2410	18(18)	0,031	-1,58
<b>24</b>	<b>2473</b>	<b>18(18)</b>	<b>0,0042</b>	<b>-1,39</b>
25	2723	18(18)	0,019	-1,59
26	2812	18(18)	0,034	-1,38
27	2844	18(18)	0,047	-1,21
<b>28</b>	<b>3202</b>	<b>18(18)</b>	<b>0,0094</b>	<b>-1,39</b>

*Average ratio* : facteur de variation d'abondance dans la condition traitée (1 ppb PCBs) par rapport à la condition contrôle (DMSO). Les spots colorés en rouge sont ceux qui varient de manière hautement significative entre les deux conditions (T-test < 0,01).





**Figure III.17 :** Photo représentant un gel bidimensionnel coloré au krypton scanné au moyen du scanner Typhoon 9400 à la longueur d'onde spécifique du krypton. La gamme de pH s'étend de 4 à 7 et les échantillons proviennent de cerveaux de têtards prélevés au stade 54-55 de la métamorphose.



**Figure III.18 :** Photo représentant un gel bidimensionnel coloré au krypton scanné au moyen du scanner Typhoon 9400 à la longueur d'onde spécifique du krypton. La gamme de pH s'étend de 4 à 7 et les échantillons proviennent de cerveaux de têtards prélevés au stade 54-55 de la métamorphose. Les ronds noirs représentent les spots qui ont été excisés du gel par l'Ettan Spot Picker.

**Tableau III.6 :** Tableau reprenant les spots sur- ou sous-exprimés ainsi que l'identification de ces protéines, dans le cerveau de têtards de *Xenopus laevis* exposés à en contamination chronique à une dose de 1 ppb d'Aroclor 1254.

N° du spot	Banque de données	pI	Mm (en kDa)	Score de Mowse	Facteur de variation	nb de peptides ms/ms	Accession : UNIPROT	Identifications
238	<i>Xenopus</i>	5,93	134	186	-1,39	7	Q8AVN7_XENLA	myosin heavy chain ( <i>Xenopus tropicalis</i> )
259	<i>Xenopus</i>	5,93	134	195	-1,24	6	Q8AVN7_XENLA	myosin heavy chain ( <i>Xenopus tropicalis</i> )
		5,49	111	106	-1,24	4	Q801S8_XENLA	alpha-1, type VI procollagen ( <i>Xenopus laevis</i> )
265	<i>Xenopus</i>	5,49	111	93	-1,37	4	Q801S8_XENLA	alpha-1, type VI procollagen ( <i>Xenopus laevis</i> )
270	<i>Xenopus</i>	5,49	111	304	-1,32	4	Q801S8_XENLA	alpha-1, type VI procollagen ( <i>Xenopus laevis</i> )
271	<i>Xenopus</i>	5,93	141	77	-1,33	7	Q7ZTI6_XENLA	alpha-1, type II collagen ( <i>Xenopus laevis</i> )
274	<i>Xenopus</i>	5,49	111	489	-1,29	9	Q801S8_XENLA	alpha-1, type VI procollagen ( <i>Xenopus laevis</i> )
277	<i>Xenopus</i>	5,49	111	476	-1,21	9	Q801S8_XENLA	alpha-1, type VI procollagen ( <i>Xenopus laevis</i> )
		5,93	134	29	-1,21	2	Q8AVN7_XENLA	myosin heavy chain ( <i>Xenopus tropicalis</i> )
553	<i>Xenopus</i>	8,08	79	114	1,32	9	Q6PGT3_XENLA	transferrin ( <i>Xenopus laevis</i> )
		5,56	85	71	1,32	7	Q7ZY90_XENLA	procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygénase 3 ( <i>Xenopus laevis</i> )
575	<i>Xenopus</i>	8,08	79	151	1,86	9	Q6PGT3_XENLA	transferrin ( <i>Xenopus laevis</i> )
610	<i>Xenopus</i>	6,09	79	99	1,63	8	Q6PGT3_XENLA	transferrin ( <i>Xenopus laevis</i> )
658	<i>Xenopus</i>	6,16	77	49	-2,47	5	Q6NTL6_XENLA	glutamine fructose-6-phosphate transaminase 1 ( <i>Xenopus laevis</i> )
		6,2	68	42	-2,47	2	Q6DFA0_XENLA	phosphoglucomutase 2-like 1 ( <i>Xenopus laevis</i> )
667	<i>Xenopus</i>	5,6	70	30	1,62	9	NF7B_XENLA	Xnf 7 protein ( <i>Xenopus laevis</i> )
671	<i>Xenopus</i>	6,96	90	293	-1,78	12	Q6GMF0_XENLA	pyrroline-5-carboxylate synthetase ( <i>Xenopus laevis</i> )
		6,98	85	50	-1,78	4	Q6DEA1_XENLA	glycyl-tRNA synthetase ( <i>Xenopus laevis</i> )
680	<i>Xenopus</i>	5,7	73	304	1,97	9	Q7ZX77_XENLA	heat shock protein, 74 kDa, A ( <i>Xenopus laevis</i> )
1568	<i>Xenopus</i>	6,15	42	629	-1,81	13	Q8AVH2_XENLA	creatine kinase, brain ( <i>Xenopus laevis</i> )
		7,8	54	291	-1,81	9	Q7SYT5_XENLA	similar to cartilage matrix protein precursor ( <i>Monodelphis domestica</i> )
		6,17	43	158	-1,81	8	Q7ZYQ9_XENLA	creatine kinase, muscle ( <i>Xenopus laevis</i> )
2129	<i>Xenopus</i>	5,7	36	577	1,32	14	Q6GR36_XENLA	annexin A5 ( <i>Rana catesbeiana</i> )
2395	<i>Xenopus</i>	5,4	25	80	1,52	6	Q7SYQ4_XENLA	peroxiredoxin 6 ( <i>Xenopus laevis</i> )
		6,04	28	80	1,52	2	Q6INE2_XENLA	UNC-119 homolog ( <i>Xenopus tropicalis</i> )
		5,5	24	78	1,52	2	Q7ZYG4_XENLA	osteoclast stimulating factor 1 ( <i>Xenopus laevis</i> )
		5,5	22	70	1,52	2	Q6DFI5_XENLA	glyoxalase I ( <i>Xenopus tropicalis</i> )
		5,9	24	51	1,52	2	Q6GM83_XENLA	tumor protein D52-like 2 ( <i>Xenopus laevis</i> )

**Tableau III.7 :** Tableau reprenant les spots sur- ou sous-exprimés ainsi que l'identification de ces protéines, dans le cerveau de têtards de *Xenopus laevis* exposés à en contamination chronique à une dose de 10 ppb d'Aroclor 1254.

N° du spot	Banque de données	pI	Mm (en kDa)	Score de Mowse	Facteur de variation	nb de peptides ms/ms	Accession : UNIPROT	Identifications
238	<i>Xenopus</i>	5,93	134	186	-1,46	7	Q8AVN7_XENLA	myosin heavy chain ( <i>Xenopus tropicalis</i> )
246	<i>Xenopus</i>	5,93	134	547	-1,63	17	Q8AVN7_XENLA	myosin heavy chain ( <i>Xenopus tropicalis</i> )
259	<i>Xenopus</i>	5,93	134	195	-1,59	6	Q8AVN7_XENLA	myosin heavy chain ( <i>Xenopus tropicalis</i> )
		5,49	111	106	-1,59	4	Q801S8_XENLA	alpha-1, type VI procollagen ( <i>Xenopus laevis</i> )
265	<i>Xenopus</i>	5,49	111	93	-1,58	4	Q801S8_XENLA	alpha-1, type VI procollagen ( <i>Xenopus laevis</i> )
270	<i>Xenopus</i>	5,49	111	304	-1,79	4	Q801S8_XENLA	alpha-1, type VI procollagen ( <i>Xenopus laevis</i> )
271	<i>Xenopus</i>	5,93	141	77	-1,4	7	Q7ZTI6_XENLA	alpha-1, type II collagen ( <i>Xenopus laevis</i> )
274	<i>Xenopus</i>	5,49	111	489	-1,76	9	Q801S8_XENLA	alpha-1, type VI procollagen ( <i>Xenopus laevis</i> )
277	<i>Xenopus</i>	5,49	111	476	-1,6	9	Q801S8_XENLA	alpha-1, type VI procollagen ( <i>Xenopus laevis</i> )
		5,93	134	29	-1,6	2	Q8AVN7_XENLA	myosin heavy chain ( <i>Xenopus tropicalis</i> )
391	<i>Xenopus</i>	5,19	106	336	-1,75	11	Q7ZYG7_XENLA	adaptor-related protein complex 2, beta 1 subunit ( <i>Xenopus laevis</i> )
		5,2	134	247	-1,75	7	Q5U235_XENLA	similar to NODAL modulator 2 ( <i>Gallus gallus</i> )
		5,2	94	177	-1,75	11	Q6DE62_XENLA	osmotic stress protein 94 kDa ( <i>Xenopus tropicalis</i> )
492	<i>Xenopus</i>	4,7	93	651	-1,35	25	Q6PAE3_XENLA	heat shock protein gp96 ( <i>Xenopus laevis</i> )
622	<i>Xenopus</i>	5,6	70	43	1,55	8	NF7B_XENLA	xnf 7 protein ( <i>Xenopus laevis</i> )
667	<i>Xenopus</i>	5,6	70	30	1,37	9	NF7B_XENLA	xnf 7 protein ( <i>Xenopus laevis</i> )
680	<i>Xenopus</i>	5,7	73	304	2,01	9	Q7ZX77_XENLA	heat shock protein, 74 kDa, A ( <i>Xenopus laevis</i> )
744	<i>Xenopus</i>	4,96	73	356	1,5	10	Q91624_XENLA	heat shock cognate protein 70 ( <i>Xenopus laevis</i> )
863	<i>Xenopus</i>	5,91	49	443	1,37	9	Q6GN87_XENLA	VAT1 protein ( <i>Xenopus tropicalis</i> )
		6,07	55	244	1,37	10	Q91589_XENLA	B fibrinopeptide ( <i>Xenopus laevis</i> )
		5,4	68	67	1,37	2	Q7ZY12_XENLA	ATPase, H <sup>+</sup> transporting, V1 subunit A, isoform 1 ( <i>Xenopus laevis</i> )
1063	<i>Xenopus</i>	6,08	58	281	1,31	11	Q6DFI9_XENLA	histidyl-tRNA synthetase ( <i>Gallus gallus</i> )
		6,2	68	246	1,31	14	Q6AX52_XENLA	keratin, type II cytoskeletal I (Clone PUF23)
		5,8	56	225	1,31	7	Q7SY64_XENLA	pepd protein ( <i>Xenopus tropicalis</i> )
1568	<i>Xenopus</i>	6,15	42	629	-2	13	Q8AVH2_XENLA	creatine kinase, brain ( <i>Xenopus laevis</i> )
		7,8	54	291	-2	9	Q7SYT5_XENLA	similar to cartilage matrix protein precursor ( <i>Monodelphis domestica</i> )
		6,17	43	158	-2	8	Q7ZYQ9_XENLA	creatine kinase, muscle ( <i>Xenopus laevis</i> )
1724	<i>Xenopus</i>	5,95	38	449	1,63	14	Q6INX9_XENLA	UDP-glucose (37.7 kD) (1N569) ( <i>Xenopus laevis</i> )
		5,8	40	107	1,63	7	Q640D3_XENLA	phosphoserine aminotransferase 1 ( <i>Xenopus tropicalis</i> )
		5,9	36	59	1,63	2	Q6GM69_XENLA	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B ( <i>Xenopus laevis</i> )
		5,75	36	31	1,63	7	Q7ZYF5_XENLA	calponin 3, acidic ( <i>Xenopus laevis</i> )
1759	<i>Xenopus</i>	6,49	37	72	-1,4	2	LDHA_XENLA	lactate dehydrogenase A ( <i>Xenopus laevis</i> )
		7,1	39	47	-1,4	3	RO31_XENLA	ribonucleoprotein ( <i>Xenopus laevis</i> )

2006	<i>Xenopus</i>	4,69	32	180	1,48	4	TPM1_XENLA	tropomyosin-1 alpha chain (Alpha-tropomyosin) ( <i>Xenopus laevis</i> )
2033	<i>Xenopus</i>	5,7	30	104	1,22	9	Q8AVW7_XENLA	capping protein beta 1 ( <i>Xenopus laevis</i> )
		6,03	58	57	1,22	4	Q7T0U9_XENLA	archain 1 ( <i>Xenopus laevis</i> )
2188	<i>Xenopus</i>	5,75	29	374	-1,34	11	Q640F3_XENLA	proteasome activator subunit 3 (synthetic construct)
		5,67	29	243	-1,34	3	Q6IP18_XENLA	replication protein A2, 32kDa ( <i>Xenopus tropicalis</i> )
		7,55	38	149	-1,34	5	Q7SZ11_XENLA	annexin A1 ( <i>Xenopus laevis</i> )
2410	<i>Xenopus</i>	6,1	24	183	-1,58	8	Q66KY8_XENLA	heat shock 27kDa protein 1 ( <i>Xenopus tropicalis</i> )
2723	<i>Xenopus</i>	8,8	49	178	-1,59	3	Q7ZXF6_XENLA	dihydrolipoamide S-succinyltransferase ( <i>Xenopus laevis</i> )
2812	<i>Xenopus</i>	8,7	21	135	-1,38	5	Q5U556_XENLA	mitochondrial ribosomal protein ( <i>Xenopus tropicalis</i> )
2844	<i>Xenopus</i>	5,5	17	105	-1,21	3	Q6DE18_XENLA	actin related protein 2/3 complex, subunit 5-like ( <i>Xenopus laevis</i> )

**Tableau III.8 :** Tableau reprenant les spots sur- ou sous-exprimés ainsi que l'identification et la fonction de ces protéines, dans le cerveau de têtards de *Xenopus laevis* exposés à en contamination chronique à une dose de 1 ppb d'Aroclor 1254.

N° du spot	Identifications	Fonctions
238	myosin heavy chain ( <i>Xenopus tropicalis</i> )	Intervient dans l'activité motrice des filaments musculaires épais ainsi que dans la liaison à l'ATP.
259	myosin heavy chain ( <i>Xenopus tropicalis</i> )	Intervient dans l'activité motrice des filaments musculaires épais ainsi que dans la liaison à l'ATP.
265	alpha-1, type VI procollagen ( <i>Xenopus laevis</i> )	Le collagène VI intervient dans la formation de la structure de la matrice extracellulaire.
270	alpha-1, type VI procollagen ( <i>Xenopus laevis</i> )	Le collagène VI intervient dans la formation de la structure de la matrice extracellulaire.
271	alpha-1, type II collagen ( <i>Xenopus laevis</i> )	Permet la production de collagène de type II qui donne de la structure et solidité au cartilage.
274	alpha-1, type VI procollagen ( <i>Xenopus laevis</i> )	Le collagène VI intervient dans la formation de la structure de la matrice extracellulaire.
277	alpha-1, type VI procollagen ( <i>Xenopus laevis</i> )	Le collagène VI intervient dans la formation de la structure de la matrice extracellulaire.
553	myosin heavy chain ( <i>Xenopus tropicalis</i> )	Intervient dans l'activité motrice des filaments musculaires épais ainsi que dans la liaison à l'ATP.
	transferrin ( <i>Xenopus laevis</i> )	Protéine de liaison qui transporte le fer.
	procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygénase 3 ( <i>Xenopus laevis</i> )	Impliquée dans les processus métaboliques. Elle est essentielle pour la stabilité des liens entre les molécules de collagène et est impliquée dans le processus de remodelage de la matrice extracellulaire.
575	transferrin ( <i>Xenopus laevis</i> )	Protéines de liaison qui transportent le fer.
610	transferrin ( <i>Xenopus laevis</i> )	Protéines de liaison qui transportent le fer.
658	glutamine fructose-6-phosphate transaminase 1 ( <i>Xenopus laevis</i> )	Elle catalyse la première étape du métabolisme des hexoseamines, convertissant la glutamine et le fructose-6-phosphate en glutamate et glucoseamine-6-phosphate.
	phosphoglucomutase 2-like 1 ( <i>Xenopus laevis</i> )	Elle est impliquée dans le métabolisme des hydrates de carbone. Elle a également une activité de phosphotransférase.
667	xnf 7 protein ( <i>Xenopus laevis</i> )	Facteur de transcription déterminant l'axe dorso-ventral du corps.
671	xnf 7 protein ( <i>Xenopus laevis</i> )	Facteur de transcription déterminant l'axe dorso-ventral du corps.
680	heat shock protein, 74 kDa, A ( <i>Xenopus laevis</i> )	Impliquée dans le contrôle de la prolifération et le vieillissement cellulaires. Elle agit aussi comme une chaperonne et est ATP dépendante.
1568	creatine kinase, brain ( <i>Xenopus laevis</i> )	Formation de phosphocréatine utilisée pour la régénération d'ATP dans les cellules où l'utilisation d'ATP est importante et/ou soudaine. Couplée à la Na <sup>+</sup> K <sup>+</sup> ATPase des synapses → transmission synaptique.
	creatine kinase, muscle ( <i>Xenopus laevis</i> )	Phosphocréatine avec couplage à la myosine phosphatase dans les muscles striés et cardiaque.
	similar to cartilage matrix protein precursor ( <i>Monodelphis domestica</i> )	Protéine sécrétée intervenant dans la liaison du collagène et elle constitue un élément important de la structure de la matrice extracellulaire.
2129	annexin A5 ( <i>Rana catesbeiana</i> )	Protéines de liaison du calcium. Ce sont également des inhibitrices de phospholipases.
2395	peroxiredoxin 6 ( <i>Xenopus laevis</i> )	Activité peroxidase.
	UNC-119 homolog ( <i>Xenopus tropicalis</i> )	Protéine adaptatrice impliquée dans le développement du système nerveux des vertébrés.
	osteoclast stimulating factor 1 ( <i>Xenopus laevis</i> )	Elle est impliquée dans l'ossification et la transduction du signal.
	glyoxalase I ( <i>Xenopus tropicalis</i> )	Protéine impliquée dans le métabolisme des hydrates de carbone.
	tumor protein D52-like 2 ( <i>Xenopus laevis</i> )	Fonction mal connue. Elle est exprimée dans différents types de cancers.

**Tableau III.9 :** Tableau reprenant les spots sur- ou sous-exprimés ainsi que l'identification et la fonction de ces protéines, dans le cerveau de têtards de *Xenopus laevis* exposés à en contamination chronique à une dose de 10 ppb d'Aroclor 1254.

N° du spot	Identifications	Fonctions
238	myosin heavy chain ( <i>Xenopus tropicalis</i> )	Intervient dans l'activité motrice des filaments musculaires épais ainsi que dans la liaison à l'ATP.
246	myosin heavy chain ( <i>Xenopus tropicalis</i> )	Intervient dans l'activité motrice des filaments musculaires épais ainsi que dans la liaison à l'ATP.
259	myosin heavy chain ( <i>Xenopus tropicalis</i> )	Intervient dans l'activité motrice des filaments musculaires épais ainsi que dans la liaison à l'ATP.
265	alpha-1, type VI procollagen ( <i>Xenopus laevis</i> )	Le collagène VI intervient dans la formation de la structure de la matrice extracellulaire.
270	alpha-1, type VI procollagen ( <i>Xenopus laevis</i> )	Le collagène VI intervient dans la formation de la structure de la matrice extracellulaire.
271	alpha-1, type II collagen ( <i>Xenopus laevis</i> )	Permet la production de collagène de type II qui donne de la structure et solidité au cartilage.
274	alpha-1, type VI procollagen ( <i>Xenopus laevis</i> )	Le collagène VI intervient dans la formation de la structure de la matrice extracellulaire.
277	alpha-1, type VI procollagen ( <i>Xenopus laevis</i> )	Le collagène VI intervient dans la formation de la structure de la matrice extracellulaire.
391	myosin heavy chain ( <i>Xenopus tropicalis</i> )	Intervient dans l'activité motrice des filaments musculaires épais ainsi que dans la liaison à l'ATP.
	adaptor-related protein complex 2, beta 1 subunit ( <i>Xenopus laevis</i> )	Cette protéine est requise pour l'activité d'une ATPase vacuolaire qui est responsable du pompage de protons et produisant une acidification des endosomes et lysosomes.
	similar to NODAL modulator 2 ( <i>Gallus gallus</i> )	Impliquée dans la liaison des hydrates de carbone.
	osmotic stress protein 94 kDa ( <i>Xenopus tropicalis</i> )	Protéine de stress osmotique appartenant à la famille des hsp 70. Elle est impliquée dans la liaison à l'ATP et le repliement protéique.
492	heat shock protein gp96 ( <i>Xenopus laevis</i> )	Protéine de stress impliquée dans le système immunitaire.
622	Xnf 7 protein ( <i>Xenopus laevis</i> )	Facteur de transcription déterminant l'axe dorso-ventral du corps.
667	Xnf 7 protein ( <i>Xenopus laevis</i> )	Facteur de transcription déterminant l'axe dorso-ventral du corps.
680	heat shock protein, 74 kDa, A ( <i>Xenopus laevis</i> )	Impliquée dans le contrôle de la prolifération et le vieillissement cellulaires. Elle agit aussi comme une chaperonne est synthétisée en réponse à un stress. Elle est ATP dépendante.
744	heat shock cognate protein 70 ( <i>Xenopus laevis</i> )	Protéine de stress appartenant à la famille des hsp 70.
863	VAT1 protein ( <i>Xenopus tropicalis</i> )	Activité oxydoréductase. Impliquée également dans la liaison des ions ferriques.
	B fibrinopeptide ( <i>Xenopus laevis</i> )	Peptide résultant du clivage du fibrinogène qui est un précurseur de la fibrine elle-même impliquée dans le processus de coagulation sanguine.
1063	ATPase, H <sup>+</sup> transporting, lysosomal 70kDa, V1 subunit A, isoform 1 ( <i>Xenopus laevis</i> )	Impliquée dans la production d'ATP couplée à un transport de protons.
	histidyl-tRNA synthetase ( <i>Gallus gallus</i> )	Responsable de la synthèse d'ARN de transfert de l'histidine.
	keratin, type II cytoskeletal I (Clone PUF23)	Intervient dans la formation des filaments intermédiaires du cytosquelette.
	pepd protein ( <i>Xenopus tropicalis</i> )	Impliquée dans la protéolyse et la peptidolyse.
1568	creatine kinase, brain ( <i>Xenopus laevis</i> )	Formation de phosphocréatine utilisée pour la régénération d'ATP dans les cellules où l'utilisation d'ATP est importante et/ou soudaine. Couplée à la Na <sup>+</sup> K <sup>+</sup> ATPase des synapses → transmission synaptique.
	similar to cartilage matrix protein precursor ( <i>Monodelphis domestica</i> )	Protéine sécrétée intervenant dans la liaison du collagène et elle constitue un élément important de la structure de la matrice extracellulaire.

1724	<p>creatine kinase, muscle (<i>Xenopus laevis</i>)</p> <p>UDP-glucose (37.7 kD) (1N569) (<i>Xenopus laevis</i>)</p> <p>phosphoserine aminotransferase 1 (<i>Xenopus tropicalis</i>)</p> <p>heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B (<i>Xenopus laevis</i>)</p>	<p>Phosphocréatine avec couplage à la myosine phosphatase dans les muscles striés et cardiaque.</p> <p>Appartient à la famille des épimérase de sucres. Elle est impliquée dans le métabolisme du galactose.</p> <p>Elle possède une activité transaminase et est également impliquée dans le processus de biosynthèse de L-sérine.</p> <p>Intervient dans l'épissage de l'ARN pré-messager et dans l'exportation de l'ARNm vers le cytosol.</p>
1759	<p>calponin 3, acidic (<i>Xenopus laevis</i>)</p> <p>lactate dehydrogenase A (<i>Xenopus laevis</i>)</p>	<p>Impliquée dans l'organisation de la structure et la biogenèse de l'actomyosine.</p> <p>Impliquée dans la glycolyse anaérobie.</p>
2006	<p>ribonucleoprotein (<i>Xenopus laevis</i>)</p> <p>tropomyosin-1 alpha chain (Alpha-tropomyosin) (<i>Xenopus laevis</i>)</p>	<p>Protéine de liaison à l'ARN.</p> <p>Lie et stabilise les filaments d'actine des cellules musculaires ou non musculaires. Elle joue un rôle central dans la contraction des muscles striés squelettiques.</p>
2033	<p>capping protein beta 1 (<i>Xenopus laevis</i>)</p>	<p>Fonctions dans l'organisation et la biogenèse du cytosquelette d'actine.</p>
2188	<p>archain 1 (<i>Xenopus laevis</i>)</p> <p>proteasome activator subunit 3 (synthetic construct)</p> <p>replication protein A2, 32kDa (<i>Xenopus tropicalis</i>)</p> <p>annexin A1 (<i>Xenopus laevis</i>)</p>	<p>Protéine de transport.</p> <p>Impliqué dans la dégradation des protéines oxydées.</p> <p>Protéine impliquée dans la réplication, la recombinaison et la réparation de l'ADN.</p> <p>Elle exerce une variété de fonctions cellulaires via la liaison à la phospholipase A2 dépendante du Ca<sup>2+</sup>, incluant un rôle crucial dans le système nerveux central.</p>
2410	<p>heat shock 27kDa protein 1 (<i>Xenopus tropicalis</i>)</p>	<p>Appartient à la petite famille des hsp 20 et agit comme un facteur de survie des neurones moteurs.</p>
2723	<p>dihydrolipoamide S-succinyltransferase (<i>Xenopus laevis</i>)</p>	<p>Impliquée dans le cycle des acides tricarboxyliques.</p>
2812	<p>mitochondrial ribosomal protein (<i>Xenopus tropicalis</i>)</p>	<p>Impliquée dans la transduction.</p>
2844	<p>actin related protein 2/3 complex, subunit 5-like (<i>Xenopus laevis</i>)</p>	<p>Fait partie d'un complexe impliqué dans le contrôle de la polymérisation de l'actine dans les cellules.</p>

**Tableau III.10 :** Tableau illustrant la répartition des protéines identifiées en classes fonctionnelles.

<p><b><u>Protéines du cytosquelette.</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Myosin heavy chain</li> <li>- Annexin A1</li> <li>- Tropomyosin-1 alpha chain</li> <li>- Actin related protein 2/3 complex, subunit 5-like</li> <li>- Capping protein beta 1</li> </ul>	<p><b><u>GTP-ases.</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Keratin type II cytoskeletal I</li> </ul>
<p><b><u>Protéines de structure.</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Alpha-1, type VI procollagen</li> <li>- Alpha-1, type II collagen</li> <li>- Procollagen-lysine, 2-oxoglutarate, 5-dioxygénase 3</li> </ul>	<p><b><u>Protéines rédox.</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Peroxiredoxin 6</li> <li>- VAT1</li> </ul>
<p><b><u>Protéines de stress.</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Heat shock protein-74</li> <li>- Osmotic stress protein-94</li> <li>- Heat shock protein gp96</li> <li>- Heat shock cognate protein-70</li> <li>- Heat shock protein-27</li> </ul>	<p><b><u>Vésicules sécrétées.</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Annexin A5</li> <li>- Similar to cartilage matrix protein precursor</li> </ul>
<p><b><u>Enzymes.</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Lactate dehydrogenase A</li> <li>- Keratin type II cytoskeletal I</li> <li>- Glutamine fructose-6-phosphate transaminase 1</li> <li>- Glyoxalase I</li> <li>- Pyrroline-5-carboxylate synthetase</li> <li>- Creatine kinase brain</li> <li>- Creatine kinase muscle</li> <li>- Glycyl-tRNA synthetase</li> <li>- Histidyl-tRNA synthetase</li> <li>- Pepd protein</li> <li>- UDP-glucose</li> <li>- Phosphoserine aminotransferase 1</li> <li>- Calponin 3, acidic</li> <li>- Dihydrolipoamide S-succinyltransferase</li> </ul>	<p><b><u>Autres protéines.</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Ribonucleoprotein</li> <li>- Phosphoglucomutase 2-like1</li> <li>- Xnf7</li> <li>- UNC-119 homolog</li> <li>- Osteoclast stimulating factor</li> <li>- Tumor protein D52-like 2</li> <li>- Adaptator-related protein complex 2, beta 1 subunit</li> <li>- Similar to NODAL modulator 2</li> <li>- B-fibrinopeptide</li> <li>- Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B</li> <li>- Proteasome activator subunit 3</li> <li>- Replication protein A2</li> <li>- Mitochondrial ribosomal protein</li> </ul>
<p><b><u>Canaux et transporteurs.</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- H<sup>+</sup>-transporting ATPase VI, subunit A</li> <li>- Transferrin</li> <li>- Archain1</li> </ul>	



**Tableau I.3 :** Impacts des PCBs sur le développement embryonnaire et larvaire du xénope *Xenopus laevis* ainsi que sur l'expression des gènes.

Référence	Espèce(s) étudiée(s)	Traitement(s)	Effets observés
Gutleb <i>et al.</i> , 2000	<i>Xenopus laevis</i> et <i>Rana temporaria</i>	<p>1) <u>Exposition à court terme (10 jours d'exposition)</u> : des têtards de <i>Xenopus laevis</i> au stade 49 de la métamorphose sont répartis en 2 groupes contrôles (contrôle 0 et contrôle positif) et 3 groupes exposés aux PCBs. Les têtards sont exposés durant 10 jours avec des aliments contaminés contenant 2 ou 200 mg/kg de Clophen A50 (mixture de PCBs) ou avec 0,2 mg/kg de PCB126. Après 10 jours de contamination, les têtards sont nourris avec de la nourriture non contaminée durant 46 jours, lorsque 75 % des têtards du groupe contrôle se soient métamorphosés (stades 65/66).</p> <p>2) <u>Exposition à long terme (exposition jusqu'à la fin de la métamorphose)</u> : des têtards de <i>Xenopus laevis</i> au stade 50 et de <i>Rana temporaria</i> au stade 25 sont exposés à des aliments contaminés (voir ci-dessus) jusqu'à ce que 75 % des contrôles se soient métamorphosés.</p>	<p>1) : La mortalité est faible (2-3 %) dans tous les groupes et aucune malformation n'est observée. Il y a un retard de la métamorphose pour les individus exposés à 2 mg/kg de Clophen A50 et dans le contrôle positif. Les animaux soumis à 2 mg/kg de Clophen A50 ont une masse plus élevée que les autres groupes.</p> <p>2) : La mortalité des têtards de xénopes exposés à la plus forte concentration en Clophen est de 42,5 % comparé au contrôle 0 (20,8 %). Les autres traitements induisent également une mortalité plus forte. De plus, le pourcentage d'animaux malformés est élevé chez les têtards exposés au PCB 126 (67,3 %) comparé au contrôle 0 (18,2 %). Des malformations au niveau des yeux et de la queue sont observées, ainsi que la présence d'oedèmes. La masse des individus exposés à 0,2 mg/kg de PCB 126 et à 200 mg/kg de Clophen est significativement plus élevée. Il y a également un retard de la métamorphose chez tous les groupes exposés. Les mêmes observations ont été faites pour les têtards de <i>Rana temporaria</i>. Par contre, pour cette espèce, aucune malformation n'a été observée.</p>
Glennemeier et Denver, 2001	<i>Rana pipiens</i> et <i>Rana sylvatica</i>	<p>1) <u>Comportement et morphologie</u> : des têtards de ces 2 espèces au stade 25 de la métamorphose ont été nourris avec de la nourriture traitée avec 1 % d'acétone (groupe contrôle). Les autres groupes ont été exposés à 10, 100 ou 1000 ng/g de 77-TCB (dissous dans 1 % d'acétone. Les têtards sont exposés durant 17 jours. Les observations comportementales ont été réalisées aux jours 5, 9, 14 et 16 après le début de l'exposition.</p>	<p>1) : Les têtards exposés aux PCBs présentent une activité et un comportement de recherche de nourriture diminués par rapport aux contrôles. Le temps passé à s'alimenter diminue avec l'augmentation de la dose de TCB après 14 et 16 jours d'exposition.</p> <p>Aucun effet sur la morphologie des têtards soumis aux PCBs n'est observé.</p>

**Tableau I.3 :** Impacts des PCBs sur le développement embryonnaire et larvaire du xénope *Xenopus laevis* ainsi que sur l'expression des gènes (suite).

2) Performance compétitive : des têtards au stade 25/26 de la métamorphose sont nourris avec de la nourriture contenant 1000 ng/g de TCB ou 1 % d'acétone. Les aquariums contenaient soit 6 têtards de *R. pipiens*, soit 12 de *R. sylvatica*, soit 6 *R. pipiens* et 12 *R. sylvatica*. Après 7 jours de traitement, les têtards sont pesés et la croissance relative est calculée.

3) Contenu en corticostérone dans l'ensemble du corps : le contenu en corticostérone est mesuré après une injection de 0,2 U. I. d'ACTH chez des têtards de *Rana pipiens* au stade 25 de la métamorphose, traités avec soit 10, 100 ou 1000 ng/g de 77-TCB. Les prélèvements de têtards ont été réalisés 5 heures après l'injection.

2) : En absence de compétition, les têtards des deux espèces ont une croissance meilleure quand ils sont nourris avec le 77-TCB par rapport aux individus contrôles, les têtards de *Rana sylvatica* montrant une réponse plus importante au TCB que ceux de *Rana pipiens*. Les têtards des deux espèces présentent une croissance plus importante en présence de compétiteurs hétérospécifiques que quand ils sont élevés seuls, mais *R. sylvatica* croit mieux que leurs compétiteurs *R. pipiens*. La réponse compétitive des deux espèces est fortement diminuée quand les têtards sont nourris avec de la nourriture contaminée au TCB.

3) : Les têtards traités avec 100 ou 1000 ng/g de TCB présentaient une diminution du contenu en corticostérone de l'ensemble du corps par rapport aux contrôles. Aucune différence dans les niveaux en corticostérone n'est observée chez le groupe contaminé avec 10 ng/g de TCB.

Jelaso *et al.*,  
2002

*Xenopus laevis*

1) Des têtards au 5<sup>ème</sup> jour PF sont exposés à 0,05, 5, 10 ou 50 ppm d'Aroclor 1254 durant deux jours.

2) Des têtards au 11<sup>ème</sup> jour PF sont exposés à 1, 10, 25 ou 50 ppm d'Aroclor 1254 durant deux jours.

L'Aroclor est dissous dans du DMSO. Un contrôle eau et un contrôle DMSO (0,25 %) sont présents pour chaque expérience. Chaque expérience est répétée 4 fois, avec des têtards issus de différentes pontes. Quatre expériences supplémentaires avec des têtards du 11<sup>ème</sup> jour PF sont ajoutées pour observer les effets à long terme à de faibles doses d'Aroclor 1254 (1 et 10 ppm).

Les jeunes têtards (5<sup>ème</sup> jour PF) sont plus résistants à l'Aroclor 1254 que les têtards plus âgés (11 jours PF) qui montrent des changements aux niveaux morphologiques, survie ou au niveau de l'expression génique. L'exposition à 25 et 50 ppm d'Aroclor provoque des altérations au niveau de la morphologie, dans le comportement de nage et diminue de façon significative le nombre de survivants. Ces têtards montrent également des diminutions significatives dans l'expression de 9 gènes sur les 11 gènes mesurés. Les têtards exposés à 10 ppm ne montrent pas d'effets mais ils présentent les mêmes profils d'expression génique que les têtards traités avec de grandes doses. Les têtards exposés à 1 ppm ne montrent aucun effet néfaste mais ils présentent une diminution significative de l'expression de 4 gènes sur 11.

**Tableau I.3 :** Impacts des PCBs sur le développement embryonnaire et larvaire du xénope *Xenopus laevis* ainsi que sur l'expression des gènes (suite).

Jelaso <i>et al.</i> , 2003	<i>Xenopus laevis</i>	Exposition durant deux jours de têtards au 18 <sup>ème</sup> jour PF à différentes doses d'Aroclor 1254 : 5, 50, 250, 300, 400, 500 et 700 ppb.	L'exposition à de faibles doses (5 et 50 ppb) augmente significativement l'expression de 6 gènes sur 10 sans aucun effet néfaste visible. L'exposition à des doses moyennes (300 et 400 ppb) diminue significativement l'expression de deux gènes avant le début des effets néfastes. L'exposition à de fortes doses (500 et 700 ppb) diminue significativement l'expression de deux gènes et cela est corrélé avec l'apparition d'anomalies morphologiques, de déficits de croissance et d'une diminution du nombre de survivants.
Fisher <i>et al.</i> , 2003	<i>Xenopus laevis</i>	Les têtards sont exposés du 5 <sup>ème</sup> au 9 <sup>ème</sup> jour PF à de l'Aroclor 1254 à des doses de 1, 10, 50 ou 100 ppm. Un contrôle eau et un contrôle DMSO (0,25 %) sont inclus pour chaque expérimentation.	Une diminution du nombre de survivants (exposition à 10, 50 et 100 ppm), diminution de l'aire de la tête (à partir de 1 ppm) et de l'aire de la queue (à partir de 10 ppm). Une altération de la morphologie de la queue est observée chez les têtards exposés à 10 ppm d'Aroclor 1254 et plus, ainsi qu'une désorganisation de la structure des cellules musculaires de la queue.
Zhou <i>et al.</i> , 2004	<i>Xenopus laevis</i>	1) 25 embryons au stade 8-11 de la métamorphose sont placés dans différents milieux contenant de la solution FETAX-medium. Deux mixtures commerciales de PCBs, l'Aroclor 1221 et 1254, sont dissoutes aux différents milieux à l'aide du solvant DMSO. Les concentrations en Aroclor étaient de 10 et 100 ng/l, 1, 10 et 100 µg/l et 1 et 10 mg/l.  2) Des têtards au 5 <sup>ème</sup> jour PF sont également exposés, durant 96 heures, à de nombreuses doses des deux mixtures, dans le but de réaliser un test de toxicité aiguë.	1) : Aucune différence significative concernant le succès d'éclosion, la mortalité, les malformations et le poids des larves. Par contre, il existe une différence significative au niveau du taux de survie des larves qui était de 4,7 % pour l'exposition à 10 mg/l d'Aroclor 1221. Les larves exposées à 10 mg d'Aroclor 1254 présentaient une dépigmentation de la peau.  2) : Une diminution du nombre de survivants avec l'augmentation de la dose de PCBs reçue est observée. La mortalité augmentait également avec le temps d'exposition. De plus, les têtards exposés à de l'Aroclor 1254 développaient une dépigmentation dépendante de la dose au-delà de 1 mg/l.

**Tableau I.3 :** Impacts des PCBs sur le développement embryonnaire et larvaire du xénope *Xenopus laevis* ainsi que sur l'expression des gènes (suite).

Jelaso <i>et al.</i> , 2005	<i>Xenopus laevis</i>	Des têtards de 5 jours PF sont contaminés avec 24, 50, 100 et 200 ppm d'Aroclor 1254 via la nourriture, jusqu'à la métamorphose.	Les têtards exposés à 100 et 200 ppm d'Aroclor se métamorphosaient plus tardivement que les contrôles. Aucun changement significatif du taux de survie, de malformations de la queue ou de comportement n'a été décelé entre les groupes traités et les contrôles. De plus, des têtards soumis à une concentration de 24 ppm d'Aroclor produisaient une augmentation significative de l'expression de 6 gènes, bien que cela ne soit pas statistiquement significatif. Une exposition à 200 ppm d'Aroclor 1254 augmente significativement l'expression du gène codant pour le cytochrome P450-1A1.
Lehigh Shirey <i>et al.</i> , 2006	<i>Xenopus laevis</i>	Des têtards de 12 jours PF sont exposés durant 80 jours à de l'Aroclor 1254 dissous dans l'eau à l'aide de 0,25 % de DMSO. Des doses de 5 et 50 ppb ont été choisies.	Les têtards exposés à 50 ppb de PCBs se trouvaient à des stades de développement inférieurs par rapport aux contrôles et aux autres conditions. Le traitement aux PCBs altère de manière significative l'expression de la transthyrétine et des déiodinases de type II et III.

**Tableau I.4 :** Résumé des effets neurotoxiques des expositions péri- et postnatales aux polychlorobiphényles (PCBs) chez les animaux (Giesy et Kannan, 2002).

PCB congener/mixture	Species, sex, age	Dose and exposure	Effects and effective doses	Reference
In-vivo studies				
3,3',4,4'- (PCB77)	CD-1 mice, pregnant female	32 mg/kg body weight, oral, prenatal exposure, 10–16 days gestation	Hyperactivity in offspring, neuromuscular dysfunction, learning and performance deficits, 'spinning' syndrome	Tilson <i>et al.</i> 1979
3,3',4,4'- (PCB77)	CD-1 mice, pregnant female	32 mg/kg bw, oral, prenatal exposure, 10–16 days gestation	Hyperactivity in offspring, reduction in brain dopamine, behavioural alterations	Agarwal <i>et al.</i> 1981
3,3',4,4'- (PCB77)	NMRI mice, male, 10 days	0.41–41 mg/kg body weight, oral, single postnatal exposure	Cholinergic system affected at 0.41 mg/kg body weight, disturbed behaviour	Eriksson <i>et al.</i> 1991
2,4,4'- (PCB28)	NMRI mice, male, 10 days	0.18, 0.36, 3.6 mg/kg body weight, oral, single postnatal exposure	After 4 months aberrations in spontaneous behaviour, lack of effect on memory and learning and on nicotinic receptors, no effect on dopamine or serotonin, $\geq 0.36$ mg/kg body weight reduced total activity	Eriksson & Fredriksson 1998
2,2',5,5'- (PCB52)	NMRI mice, male, 10 days	0.2, 0.41, 4.1 mg/kg body weight, oral, single postnatal exposure	After 4 months aberrations in spontaneous behaviour, deficits in memory and learning function, cholinergic nicotinic receptors affected no effect on dopamine or serotonin, $\geq 4.1$ mg/kg body weight reduced total activity	Eriksson & Fredriksson 1998
2,3',4,4',5- (PCB118)	NMRI mice, male, 10 days	0.23, 0.46, 4.6 mg/kg body weight, oral, single postnatal exposure	No significant changes in spontaneous and swim-maze behaviour up to the of $\geq 4.6$ mg/kg body weight	Eriksson & Fredriksson 1998
2,3,3',4,4',5- (PCB 156)	NMRI mice, male, 10 days	0.25, 0.51, 5.1 mg/kg body weight, oral, single postnatal exposure	No significant changes in spontaneous and swim-maze behaviour up to the of $\geq 4.6$ mg/kg body weight	Eriksson & Fredriksson 1998
2,2',5,5'- (PCB52)	NMRI mice, male, 10 days	4.1 mg/kg body weight, oral, single postnatal exposure	At 4 months decrease in rearing, locomotion and total activity	Eriksson & Fredriksson 1998

**Tableau I.4 :** Résumé des effets neurotoxiques des expositions péri- et postnatales aux polychlorobiphényles (PCBs) chez les animaux (suite) (Giesy et Kannan, 2002).

PCB congener/mixture	Species, sex, age	Dose and exposure	Effects and effective doses	Reference
3,3',4,4',5- (PCB126)	Sprague-Dawley rats, both sexes, 5–7 weeks (weanling)	0.1–100 ng/g in diet for 13 weeks, oral, postnatal	Growth suppression, thymic atrophy, increased liver weight, anaemia, no significant alterations in biogenic amines, NOAEL = 0.1 ng/g in diet or 8.7 µg/kg body weight/day	Chu <i>et al.</i> 1994
3,3',4,4'- (PCB77)	Sprague-Dawley rats, both sexes, 5–7 weeks (weanling)	10–10 000 ng/g in diet for 13 weeks, oral, postnatal	Increased EROD activity, decreased vitamin A, altered dopamine and homovanillic acid in brain, histopathological changes in thyroid and liver, NOAEL = 100 ng/g in diet or 0.01 µg/kg body weight/day	Chu <i>et al.</i> 1995
2,3',4,4',5- (PCB118)	Sprague-Dawley rats, both sexes, 5–7 weeks (weanling)	10–10 000 ng/g in diet for 13 weeks for males, 2–2000 ng/g for females, oral, postnatal	Increased EROD activity, reduced dopamine and homovanillic acid in brain, histopathological changes in thyroid and liver, brain residues at the highest dose 0.36–1.0 µg/g, NOAEL = 200 ng/g in diet or 17 µg/kg body weight/day	Chu <i>et al.</i> 1995
2,2',4,4',5,5'- (PCB153)	Sprague-Dawley rats, both sexes, 5–7 weeks (weanling)	50–50000 ng/g in diet for 13 weeks, oral, postnatal	Increased EROD activity, reduction in hepatic vitamin A, decreased dopamine and its metabolites, females more sensitive, histological changes in thyroid and liver, highest dose brain residues 16–29 µg/g, NOAEL = 500 ng/g in diet or 24 µg/kg body weight/day	Chu <i>et al.</i> 1996
2,2',3,3',4,4'- (PCB128)	Sprague-Dawley rats, both sexes, 5–7 weeks (weanling)	50–50000 ng/g in diet for 13 weeks, oral, postnatal	Increased EROD activity, reduction in hepatic vitamin A, decreased dopamine and its metabolites, females more sensitive, histological changes in thyroid and liver, highest dose brain residues 5–10 µg/g, NOAEL = 500 ng/g in diet or 42 µg/kg body weight/day	Lecavalier <i>et al.</i> 1997

**Tableau I.4 :** Résumé des effets neurotoxiques des expositions péri- et postnatales aux polychlorobiphényles (PCBs) chez les animaux (suite) (Giesy et Kannan, 2002).

PCB congener/mixture	Species, sex, age	Dose and exposure	Effects and effective doses	Reference
3,3',4,4',5- (PCB126)	Lewis rats, adult female	10 and 20 µg/kg body weight on days 9,11,13,15,17 and 19 of gestation, oral, prenatal	Fetotoxicity, delayed physical maturation, reduced body weight in offspring, increased liver weight and EROD activity, no effect on learning or neurobehavioural performance, no residues in brain, exhibited sex differences in neurotoxicity	Bernhoft <i>et al.</i> 1994
3,3',4,4',5- (PCB126)	Lewis rats, adult female	2 µg/kg body weight on days 10,12,14,16,18 and 20 days of gestation, oral, prenatal	Neurotoxic effects in offspring, no fetotoxicity, behavioural alterations, hyperactivity, impaired discrimination learning, no brain residues	Holene <i>et al.</i> 1995
2,3',4,4',5- (PCB118)	Lewis rats, adult female	1 and 5 mg/kg body weight on days 10,12,14,16,18 and 20 days of gestation, oral, prenatal	Neurotoxic effects in offspring, fetotoxicity, behavioural alterations, hyperactivity, impaired discrimination learning, brain residues 6–982 ng/g	Holene <i>et al.</i> 1995
3,3',4,4'- (PCB77)	Wistar rats, adult female	1 mg/kg body weight, days 7–18 of gestation, subcutaneous injection, prenatal	Behavioural effects in offspring, PCB concentrations in brain 0.15 µg/g	Weinand-Hurer <i>et al.</i> 1997
2,2',4,4'- (PCB28)	Wistar rats, adult female	1 mg/kg body weight, days 7–18 of gestation, subcutaneous injection, prenatal	Behavioural effects in offspring, PCB concentrations in brain 0.61 µg/g	Weinand-Hurer <i>et al.</i> 1997
Fenclor 42	Fischer rats, adult female	5–10 mg/kg body weight/d intake or 25–50 mg/kg, i.p., five injections daily, 2 weeks prior to mating, prenatal	Neurotoxicity and behavioural alterations, 40 mg/kg resulted in significant postweaning behavioural effects, LOAEL = 10 mg/kg body weight/day	Pantaleoni <i>et al.</i> 1988
Aroclor 1254	Wistar rats, adult female	0.2–26 µg/g in diet, preweaning, perinatal exposure	Impaired neurological development, LOAEL = 2.5 µg/g	Overmann <i>et al.</i> 1987
Aroclors 1254 and 1260	Wistar rats, adult male	500–1000 mg/kg body weight, single oral exposure, postnatal	Decrease in dopamine, norepinephrine and serotonin concentrations in specific regions in brain up to 14 days after exposure	Seegal <i>et al.</i> 1986

**Tableau I.4 :** Résumé des effets neurotoxiques des expositions péri- et postnatales aux polychlorobiphényles (PCBs) chez les animaux (suite) (Giesy et Kannan, 2002).

PCB congener/mixture	Species, sex, age	Dose and exposure	Effects and effective doses	Reference
Aroclor 1254	Wistar rats, adult male	500–1000 mg/kg body weight, oral exposure for 30 d, postnatal	Dopamine and its metabolites decreased, PCB concentrations in brain after 30 days were 70–82 µg/g, 6 di- <i>ortho</i> and 3-mono- <i>ortho</i> congeners dominated	Seegal <i>et al.</i> 1991A
Aroclor 1254	Wistar rats, adult female	5 and 25 mg/kg body weight from day 10–16 of gestation, prenatal, oral	Alterations in serotonin metabolism in the brains of offspring after 21 and 90 days of birth, other biogenic amines (e.g. dopamine, norepinephrine) in brain were unaffected, effect was significant at dose 25 mg/kg body weight	Morse <i>et al.</i> 1996a
Aroclor 1254 and 3,3',4,4'-	Wistar rats, adult female	5 and 25 mg/kg body weight from day 10–16 of gestation, prenatal, oral	Reduced plasma thyroid hormone, plasma concentrations of hydroxylated metabolite of PCB153 was greater than the 153 in foetus, neonates and weanling rats, foetus brain thyroid residues affected, effect of OH-PCBs on brain is discussed	Morse <i>et al.</i> 1996a
Clophen A30	Wistar rats, adult female	5 and 30 mg/kg bw in diet or intake of 0.4 and 2.4 mg/kg day, from 60 days prior to mating until 21 days after birth, oral	<b>Behavioural effects</b> , PCDF contamination in Clophen – 2.5 mg/kg, brain concentration = 60 ng/g after 420 days of exposure, PCBs 25, 52 and 101 were the prevalent ones	Lilienthal <i>et al.</i> 1990
Aroclor 1016	Pig-tailed macaque (Macaca nemestrina), male, 3–5 years	0.8–3.2 mg/kg body weight/day, for 20 weeks, oral, postnatal	Persistent reduction in brain dopamine, brain PCB concentrations 1–5 µg/g, only PCBs 28, 47 and 52 accumulated in brain, lightly chlorinated PCB mixtures are more effective than heavily chlorinated ones	Seegal <i>et al.</i> 1990



**Tableau I.4 :** Résumé des effets neurotoxiques des expositions péri- et postnatales aux polychlorobiphényles (PCBs) chez les animaux (Giesy et Kannan, 2002).

PCB congener/mixture	Species, sex, age	Dose and exposure	Effects and effective doses	Reference
Aroclor 1260	Pig-tailed macaque (Macaca nemestrina), male, 3–5 years	0.8–3.2 mg/kg body weight/day, for 20 weeks, oral, postnatal	Persistent reduction in brain dopamine, brain PCB concentrations 18–28 µg/g, di-ortho-substituted hexa- and heptaCBs accumulated in brain, less effective to reduce dopamine as compared to Aroclor 1016 exposure	Seegal <i>et al.</i> 1991
Aroclor 1248	Rhesus monkeys, adult female	0.5–2.5 mg/kg in diet, exposed before and during gestation, cumulative PCB intake was 293 mg oral, perinatal,	Hyperactivity in offspring, behavioural deficits, PCB concentrations in body fat was 20 µg/g	Bowman <i>et al.</i> 1981
In-vitro or ex-vivo studies				Chishti <i>et al.</i> 1996
Aroclors 1254:1260 (1:1)	Wistar rats, male, 65 days	10–100 µg/g in media, 6 h exposure Ex vivo brain tissue,	Decrease in dopamine and its metabolites at 20 µg/g or above, brain total PCB concentration at the effective dose was >15 µg/g	Chishti <i>et al.</i> 1996
Aroclor 1254	PC-12 cells	1–100 µg/g, <i>in vitro</i> , 6-h exposure	Increase followed by a decrease in cellular catecholamine	Seegal <i>et al.</i> 1989
2,2'- (PCB4)	Long-Evans hooded rats, adult male	50–200 µmol, <i>in vitro</i> , cerebellar granule cells exposed	Altered Ca <sup>2+</sup> homeostasis in cerebellar granule cells, IC <sub>50</sub> = 6.17 µmol, more effective than PCB126	Kodavanti <i>et al.</i> 1993a, 1993b
3,3',4,4',5- (PCB126)	Long-Evans hooded rats, adult male	50–200 µmol, <i>in vitro</i> , cerebellar granule cells exposed	Altered Ca <sup>2+</sup> homeostasis in cerebellar granule cells, IC <sub>50</sub> = 6.17 µmol, more effective than PCB126	Kodavanti <i>et al.</i> 1993a, 1993b
2,2'- (PCB4)	Long-Evans hooded rats, male, adult 40–90 days	10–100 µmol, <i>in vitro</i> , mitochondrial and synaptosomal preparations from brain exposed	Mg <sup>2+</sup> -ATPase activity inhibited, but not Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase activity, ED <sub>50</sub> is roughly 25 µmol	Maier <i>et al.</i> 1994
3,3',4,4',5- (PCB126)	Long-Evans hooded rats, male, adult 40–90 days	10–100 µmol, <i>in vitro</i> , mitochondrial and synaptosomal preparations from brain exposed	Mg <sup>2+</sup> ± ATPase activity was not inhibited up to the dose of 100 µmol	Maier <i>et al.</i> 1994
2,2',3,5',6- (PCB95)	Sprague-Dawley rats, male	1–200 µmol, <i>in vitro</i> , microsomes of rat brain hippocampus	Alterations in neuronal Ca <sup>2+</sup> signal and neuroplasticity, EC <sub>50</sub> = 12 µmol	Wong <i>et al.</i> 1997
2,3',4,4'- (PCB66)	Sprague-Dawley rats, male	1–200 µmol, <i>in vitro</i> , microsomes of rat brain hippocampus	No effect was found on [ <sup>3</sup> H] ryanodine receptors suggesting no alterations in neuronal Ca <sup>2+</sup> signal up to 200 µmol exposure	Wong <i>et al.</i> 1997 brain up to 14 days after exposure